E 1330

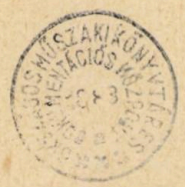
ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

1
ANUL VII
1964

studii și cercetări de biochimie

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

1

ANUL VII

1964

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

COMITETUL DE REDACȚIE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, *redactor responsabil*; H. SLUȘANSCHI, *redactor responsabil adjunct*; S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU, CECILIA ȘELARU, *secretar de redacție*.

REVISTA STUDII ȘI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

APARE DE 3 ORI PE AN

Redacția : BUCUREȘTI, Str. Popovici nr. 20

Tel. 18.43.55 — 17.79.63

ACADEMIA REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul VII, nr. 1 1964

SUMAR

Pag.

EUGEN MACOVSCHI, Unele aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii (Notă preliminară) 5

I. MANTA, D. BEDELEANU şi O. BÎRZU, Biochimia ateromatozei. Nota VI. Asupra factorilor de limitare a glicolizei şi consumului de oxigen tisular în ateromatoza experimentală 9

I. D. POPPOFF şi D. I. GHEORGHIEV, Introducerea substanţelor în plante prin metoda capilară 19

A. SPORN şi ILEANA DINU, Influenţa unor substanţe chimice folosite în industria alimentară asupra activităţii enzimatice a ficatului 23

GH. FURNICĂ şi A. DIMITRIU, Studiul acţiunii compuşilor radiomimetici (N-iperite) asupra macromoleculelor proteice 35

VICTOR GHEŢIE şi LUCIA BUZILĂ, Crioprecipitarea în sucurile plasmatice ale unor seminţe 47

C. GURBAN şi ELENA CRISTEA, Efectul fluorurii şi al concentraţiei adenozintrifosfatului asupra vitezei şi eficienţei fosforilării oxidative în mitocondrii 57

CORNELIU MEDEŞAN, Compararea unor metode de dozare a fosfocreatinei musculare în diferite condiţii experimentale 67

NATALIA MOLDOVEANU, Acţiunea anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la o-, m-, p-fenilendiamină şi benzidină . . . 77

EUG. PĂUNESCU, ANCA CIOLAC-NEGOESCU şi GH. PISICĂ, Influenţa Tween 80 şi a penicilinei asupra proprietăţilor fizico-chimice ale peretelui celular la micobacterii 83

P. RAICU şi M. ELIAS, Influenţa unui preparat de ADN asupra creşterii şi pigmentaţiei coleoptilelor de grîu 91

TRAIAN RĂDULESCU, DITA COTARIU şi LORA SCOLNIC, Fosforul anorganic şi exosmoza lui din muşchi în diferite stări de excitabilitate şi efort 97

AL. SAUCIUC, MARGARETA BUDĂI, M. RUSAN şi RODICA BOSTAN, Asupra prezenţei penicilinelor străine în fermentaţia industrială cu două tulpini de *Penicillium chrysogenum* 105

GR. TURCU, C. DIMOFTACHE, P. WEXLER şi V. VASILESCU, Studiu citochimic şi citospectrofotometric pe seria albă a şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P 109

RECENZII 117

NECROLOG 143

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE

UNELE ASPECTE CIBERNETICE ÎN PROBLEMA STRUCTURII MATERIEI VII

(NOTĂ PRELIMINARĂ)

DE

ACADEMICIAN **EUGEN MACOVSCHI**

În lucrările precedente [1], [2] a fost expusă o nouă ipoteză cu privire la natura și structura materiei din care sînt alcătuite organismele vii. Deosebirea dintre această ipoteză și concepția actuală despre materia menționată, iese bine în evidență din prezentarea comparativă și sumară a celor două puncte de vedere.

Conform concepției actuale, protoplasma*) — considerată în totalitatea ei ca materie vie — este alcătuită dintr-o mulțime de componente bine definite din punct de vedere chimic. Cum însă nici una dintre componentele chimice ale protoplasmei nu manifestă fenomenele vieții, deosebirea dintre viu și neviu se caută la nivelul reacțiilor dintre componentele amintite, adică la nivelul transformărilor chimice care se produc în ființele vii. Se consideră că viața este condiționată de reacțiile chimice care se săvîrșesc în protoplasmă și al căror ansamblu constituie metabolismul, că diferitele ființe vii se deosebesc între ele prin particularitățile metabolismului lor și că transformarea unei ființe cu anumite însușiri într-o altă ființă cu alte însușiri implică modificarea metabolismului ei [2 *a*].

Spre deosebire de concepția de mai sus, conform ipotezei noastre protoplasma este alcătuită din două feluri distincte de materii, formate din aceleași particule materiale : materia vie și materia nevie, care se întrepătrund și se află în relații de coexistență funcțională [1]. Materia vie există numai în protoplasma vie, se formează prin asimilația diferitelor substanțe nevii, are o structură cu totul specială, aflată pe o treaptă superioară de organizare și imprimă protoplasmei acele însușiri și stări specifice, ale căror manifestări urmează legi biologice cu conținut propriu. Materia nevie din protoplasmă este alcătuită din diferiți compuși chimici organici și anorganici obișnuiți, care împreună cu materia vie condiționează viața protoplasmei. Procesele chimice care se produc la nivelul materiei nevii din protoplasmă reprezintă biochimismul acesteia, iar asimilația, dezasimilația și toate transformările de ordin chimic care se produc în materia vie a protoplasmei reprezintă metabolismul ei. Diferitele ființe se deosebesc prin particularitățile structurii materiei lor

*) Sub denumirea de „protoplasmă" înțelegem conținutul viu al celulei.

vii, iar transformarea unei ființe în alta, cu alte însușiri, implică modificarea structurii materiei vii cuprinsă în ființa respectivă [2 *b*].

Admițînd că structura condiționează însușirile materiei vii, iar acestea manifestarea fenomenelor vieții, s-a dedus că prin cercetarea fenomenelor vieții se poate ajunge la cunoașterea însușirilor materiei vii, iar de aici la caracterizarea structurii acestei materii. Așa de exemplu, fenomenul însuși al vieții, conservatismul ereditar și variabilitatea organismelor oglindesc reactivitatea permanentă, stabilitatea relativă și plasticitatea reversibilă a materiei vii, însușiri care la rîndul lor reflectă dinamismul permanent, echilibrul relativ și deformabilitatea reversibilă a structurii acestei materii [2 *c*].

Dacă structura materiei vii se caracterizează printr-un anumit dinamism permanent, un anumit echilibru relativ și o anumită deformabilitate reversibilă, înseamnă că structura materiei vii include, ca părți integrante, anumite configurații structurale capabile să asigure desfășurarea permanentă și automată a proceselor de autoreglare, condiționate de fenomenele de comandă și control, procese fără de care echilibrul relativ și deformabilitatea reversibilă ale unei structuri dinamice sînt de neconceput. Or, cu procesele de comandă și control la mașini și organisme, cu sistemele de reglaj automat și cu proprietățile generale ale acestor sisteme se ocupă cibernetica. Această știință arată că desfășurarea permanentă și automată a oricărui proces de autoreglare se realizează prin existența și participarea succesivă la el a anumitor elemente constitutive, caracteristice, ca : prezența și folosirea unei „informații" adecvate; existența unor „factori operatori" capabili să prelucreze informația, și a unor „condiții logice" capabile să determine acea succesiune a fenomenelor parțiale, care asigură procesul autoreglării; coexistența „sistemelor de reglare" și „contrareglare", prezența unor „canale" de transmitere a mesajelor purtătoare de comenzi etc. Dată fiind universalitatea principiilor cibernetici, nu rămîne decît să admitem că menționatele elemente constitutive ale proceselor de autoreglare sînt cuprinse în structura dinamică a materiei vii, ceea ce face ca cel puțin din acest punct de vedere, structura materiei vii să poată fi încadrată în acele sisteme cu activitatea automată care sînt cercetate de cibernetică și se supun legilor acesteia. De aici concluzia : problema structurii materiei vii include aspecte cibernetice și, prin aceasta, se deosebește fundamental de problema structurii oricăror compuși organici sau anorganici cunoscuți, indiferent de complexitatea structurii chimice a moleculelor lor.

Conturarea diferitelor aspecte cibernetice în problema structurii materiei vii depinde de modul cum se concep atît natura procesului de asimilație, cît și repercusiunile acestui proces asupra structurii chimice a substanțelor asimilate.

În privința naturii procesului de asimilație, s-a dedus că asimilația, adică transformarea substanțelor chimice obișnuite în materie vie, constă în integrarea acestor substanțe într-o structură cu totul specială, aflată pe o treaptă superioară de organizare în comparație cu structura și organizarea materiei nevii. Prin integrarea în această structură specială, substanțele asimilate încetează a mai fi ceea ce au fost și participă într-un

mod nou la manifestarea însușirilor și stărilor materiei vii în a cărei structură s-au încadrat. Prin urmare, la alcătuirea materiei vii participă tot compușii chimici obișnuiți, care însă sînt astfel asamblați în cadrul noii structuri caracteristice, și cu totul speciale, încît prin această structură devine posibilă manifestarea însușirilor specifice ale materiei vii [2 *d*].

Acum rămîne de precizat dacă integrarea diferitelor substanțe chimice obișnuite în structura materiei vii se face cu sau fără modificarea profundă și ireversibilă a structurii lor chimice proprii.

Unele fapte cunoscute în biochimie și biologie tind să arate că, în general, cea de-a doua alternativă pare a fi mai probabilă. Într-adevăr : dacă prin asimilație, adică prin încadrare în structura materiei vii, proteinele, acizii nucleici, fosfolipidele și alte substanțe organice și-ar pierde sau și-ar modifica continuu și reversibil structura lor chimică proprie, nu ar fi posibilă menținerea îndelungată a calității specifice a materiei vii, caracteristică fiecărui fel de organism în parte.

O astfel de concluzie corespunde și premiselor ciberneticii, căci manifestarea fenomenelor parțiale ale proceselor de autoreglare și succesiunea lor algoritmică în timp implică existența unei structuri adecvate, cu anumită repartiție spațială reciprocă a acelor elemente constitutive care, alcătuind anumite formațiuni structurale, asigură mersul proceselor de autoreglare în structura materiei vii.

Pe baza considerațiilor de mai sus, se pot face precizări relativ la unele aspecte cibernetice ale structurii materiei vii, ca cele ce privesc informația cuprinsă în această structură, rolul cibernetic al diferitelor substanțe care prin asimilație devin parte integrantă a structurii acestei materii, natura cvadridimensională a structurii materiei vii etc.

În legătură cu informația cuprinsă în structura materiei vii, luăm în considerație acele deducții conform cărora moleculele substanțelor organice, integrate prin asimilație în structura materiei vii, își pot păstra structura lor chimică. Aceasta înseamnă că informația codificată cuprinsă în macromoleculele acizilor nucleici, diferitelor substanțe proteice și altor compuși organici, nu numai că nu se pierde în urma asimilării lor, dar capătă noi posibilități de manifestare în cadrul structurii dinamice a materiei vii. Mai mult : coexistența, în structura acestei materiei, a moleculelor substanțelor organice cu informație diferită și posibilitatea apariției unei informații noi prin însăși codificarea aranjării spațiale reciproce a moleculelor substanțelor asimilate, fac ca numărul variantelor sub care se poate prezenta structura dinamică a materiei vii să fie practic infinit. Totodată, rezultă că materia vie concentrează în structura sa o cantitate uriașă de informație de calități diferite, ceea ce prezintă pentru biologie un interes deosebit.

Rolul cibernetic al diferitelor substanțe, devenite prin asimilație parte integrantă a structurii vii, poate fi conturat pe baza principiului corelației dintre structură și funcție. Ar fi greu de presupus că variatele și multiplele funcții cibernetice care se realizează în cadrul structurii dinamice a materiei vii ar putea fi asigurate de moleculele asimilate ale uneia și aceleiași substanțe. Este mult mai probabil că asemenea funcții necesită participarea substanțelor cu structuri chimice diferite și se rea-

lizează în materia vie tocmai datorită naturii diferite a substanțelor din care se formează această materie. Prin urmare, moleculele diferitelor substanțe încadrate, prin asimilație, în structura materiei vii, nu numai că încetează de a fi ceea ce au fost și participă într-un mod nou la manifestarea stărilor și însușirilor materiei vii, dar capătă anumite funcții noi, funcții cibernetice, pe care nu le-au avut înainte de asimilație și pe care le manifestă numai în structura materiei vii. Identificarea funcțiilor cibernetice ale diferitelor substanțe din care se formează materia vie și apoi stabilirea mecanismului fenomenelor cibernetice la care participă aceste substanțe, vor forma obiectul viitoarelor cercetări.

În ceea ce privește structura materiei vii, este de menționat că această structură este susceptibilă de a fi interpretată ca un sistem cvadridimensional, datorită pe de o parte distribuției spațiale a moleculelor substanțelor organice asimilate, încadrate în ea, iar pe de altă parte dinamismului său specific care include elementul timp, ca sistem de referință oglindit în activitatea ritmică a fenomenelor de autoreglare. Or, un astfel de sistem cu organizare cvadridimensională reprezintă o engramă biologică, adică un substrat biologic al memorării celor mai diferite mesaje provenite din mediul extern sau intern, care joacă probabil un anumit rol în desfășurarea fenomenelor vieții.

Acestea sînt numai unele dintre aspectele cibernetice în problema structurii materiei vii, altele urmînd să fie scoase în evidență și aprofundate în cadrul altor lucrări. În general însă, este de remarcat că valabilitatea deducțiilor de mai sus este oarecum limitată, deoarece raționamentele făcute pe baza unui număr restrîns de premise fac ca și concluziile respective să fie valabile numai în raport cu premisele de la care s-a pornit. Într-adevăr din nenumăratele fenomene ale vieții, au fost luate în considerație numai trei : viața ca atare, conservatismul ereditar și variabilitatea organismelor ; de aici s-au dedus numai trei însușiri ale materiei vii : reactivitatea permanentă, stabilitatea relativă și plasticitatea reversibilă care, la rîndul lor, ne-au indicat numai trei din multele caracteristici ale structurii materiei vii : dinamismul permanent, echilibrul relativ și deformabilitatea reversibilă. Înseamnă că cele trei caracteristici ale structurii materiei vii, care indică existența unor aspecte cibernetice în structura acestei materii, sînt insuficiente pentru caracterizarea multilaterală a structurii materiei vii, ceea ce implică atît continuarea investigațiilor teoretice, cît și inițierea cercetărilor experimentale în acest domeniu.

Prezentată la redacție
la 15 octombrie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.
și
Catedra de biochimie a
Universității din București

BIBLIOGRAFIE

1. E. MACOVSCHI, *Die lebende Materie und ihre Entstehung*, Revue de Chimie, **IV**, *1*, 11 (1959).
2. E. MACOVSCHI, *Materia vie și rolul ei în hibridarea plantelor*, Studii și cercetări de biochimie, **6**, *4*, 467 (1963); *a*) p. 469—471; *b*) p. 471—473; *c*) p. 474—475; *d*) p. 472.

BIOCHIMIA ATEROMATOZEI

NOTA VI. ASUPRA FACTORILOR DE LIMITARE A GLICOLIZEI ŞI CONSUMULUI DE OXIGEN TISULAR ÎN ATEROMATOZA EXPERIMENTALĂ

DE

I. MANTA, D. BEDELEANU şi O. BÎRZU

Interesarea metabolismului energetic în ateromatoză suscită tot mai mult atenţia cercetărilor. Datele de histochimie indică în majoritatea cazurilor scăderea activităţii enzimelor legate direct de procesele energetice din peretele vascular (aortă) în cursul ateromatozei [9], [11], [12]. Această situaţie este explicabilă, deoarece în ateromatoză asistăm la o adevărată „sufocare" a ţesutului vascular de către plăcile lipoidice. În schimb, este mai puţin cunoscută şi studiată semnificaţia biochimică a tulburărilor de la nivelul diferitelor organe, deşi indicaţii experimentale asupra alterării metabolismului glucidic în ateromatoză sînt semnalate în literatură [25] şi au fost constatate şi în cercetările noastre anterioare [14]. [17].

În sprijinul celor de mai sus este suficient să menţionăm că o probă simplă cum este aceea a hiperglicemiei provocate, evidenţiază la animalele cu ateromatoză o curbă similară diabetului [14]. Explorarea sistemului pancreatic endocrin (nivelul insulinemiei, curba de toleranţă la insulină-glucoză) [16], precum şi incidenţa ateromatozei clinice cu diabetul [19], pledează pentru comportarea diferită a bolnavului cu ateromatoză faţă de normali.

Lucrarea de faţă urmăreşte modificările metabolismului glucidic şi energetic celular în ateromatoza experimentală, în scopul stabilirii unor verigi alterate şi a repercusiunilor acestor dereglări asupra organismului.

MATERIAL ŞI METODĂ

Cercetările au fost efectuate pe iepuri de ambele sexe, în greutate de 3—4 kg, cărora li s-a produs ateromatoza experimentală, după Anicicov, printr-un regim aterogen instituit de noi (14). Instalarea ateromatozei a fost verificată prin sindromul biochimic (lipemie, colesterolemie, electroforeză), gradul de tulburare al serului şi examenul anatomo-patologic.

Determinările au fost efectuate concomitent pe animale martor şi cu ateromatoză experimentală, avînd aproximativ aceeaşi vîrstă şi greutate.

După sacrificarea animalelor se izolează ficatul, rinichiul şi miocardul, se spală cu soluţie izotonică de clorură de potasiu, se omogenizează în aparatul Potter, obţinîndu-se astfel suspensii

tisulare de diferite concentraţii, în funcţie de natura determinării. Toate operaţiile se fac între 0° şi 4°C.

S-au efectuat următoarele determinări :

1. *Hexochinaza*, după metoda Zaharin [27], măsurînd viteza de fosforilare a glucozei în prezenţa omogenatului şi ATP-ului. Glucoza s-a determinat după metoda Somogy-Nelson (citat de [1]). Rezultatele sînt exprimate în µmoli glucoză fosforilată la 37°C/oră/mg N proteic.

2. *Glucozo-6-fosfataza*, după Swanson [24], determinînd cantitatea de fosfat anorganic eliberat din glucozo-6-fosfat sub acţiunea omogenatului la 37°C/10 minute/mg N proteic.

3. *Aldolaza*, după metoda Herbert şi colab. [8], determinînd cantitatea de fosfor al triozelor, eliberat la 38°C/minut/1 mg N proteic.

4. *Sorbitdehidrogenaza (SDH)*, după tehnica preconizată de Gerlach [6], adaptată de noi. Activitatea se exprimă în unităţi spectrofotometrice/ml extract tisular (corespunzînd la 50 mg ţesut umed). Omogenatul tisular, după o extracţie prealabilă de 30 minute la gheaţă, a fost centrifugat la 25 000 *g*, timp de 10 minute la 2°C. Supernatantul obţinut s-a introdus direct în testul optic. Unitatea spectrofotometrică reprezintă scăderea sub acţiunea enzimei a extincţiei $DPNH_2$ cu 0,001 la 366 mµ la 24°C în 5 minute.

5. *Citocromoxidaza*, după metoda Pigareva şi Cetverikov [21], măsurînd manometric, în aparatul Warburg, consumul de oxigen în prezenţa citocromului. Ca agent reducător am utilizat acidul ascorbic. Determinările au fost efectuate la 37°C, în atmosferă de oxigen/60 minute. Rezultatele sînt exprimate în µl oxigen/mg proteină.

6. *Coenzima acetilantă (Co A)* s-a determinat după procedeul lui Bratton şi Marshall citat după [5]), bazat pe testul de acetilare al sulfanilamidei. Apoenzima s-a preparat din ficat de porumbel, după tehnica Novelli (citat [7]). Rezultatele sînt exprimate în µg sulfamidă acetilată/g ţesut umed.

7. *Consumul de oxigen* al secţiunilor şi omogenatelor de ficat s-a determinat utilizînd metoda manometrică Warburg. Determinările s-au efectuat pe 400 mg ţesut umed (sub formă de secţiuni, respectiv omogenat 20%) timp de 40 de minute la 25°C. Rezultatele sînt exprimate în µl oxigen consumat. Diferitele variante utilizate sînt indicate în text şi în figurile 1 *a* şi 1 *b*.

REZULTATE

În tabela nr. 1 sînt prezentate rezultatele obţinute în privinţa unor enzime interesate în metabolismul glucidic : aldolaze, hexochinaze, glucozo-6-fosfataza, în miocardul, ficatul şi rinichiul animalelor cu ateromatoză experimentală şi martori.

În tabela nr. 2 sînt prezentate variaţiile unor enzime de oxidoreducere : citocromoxidaza, sorbitdehidrogenaza, precum şi al coenzimei acetilante, în aceleaşi organe şi condiţii.

Figura 1 *a* prezintă consumul de oxigen al secţiunilor de ficat, fără adaos de substrat, precum şi la adaos de piruvat, succinat sau acetat, fără şi cu dinitrofenol (DNP) ca agent decuplant.

Figura 1 *b*, la fel, pentru omogenate de ficat (20%).

Rezultatele fiind variate în funcţie de organul studiat, considerăm necesar, înainte de a trece la discutarea lor, o sistematizare conform tabelelor nr. 1 şi 2, din care rezultă următoarele :

În cazul ficatului, la animalele cu ateromatoză experimentală toţi indicatorii studiaţi sînt diminuaţi faţă de martori, proporţia scăderii

variind între 25 și 45%. Faptul este explicabil, deoarece în urma regimului hiperlipidic-colesterolat se instalează o steatoză hepatică, simultan cu procesul de ateromatoză. Încărcarea grasă a celului hepatice are drept

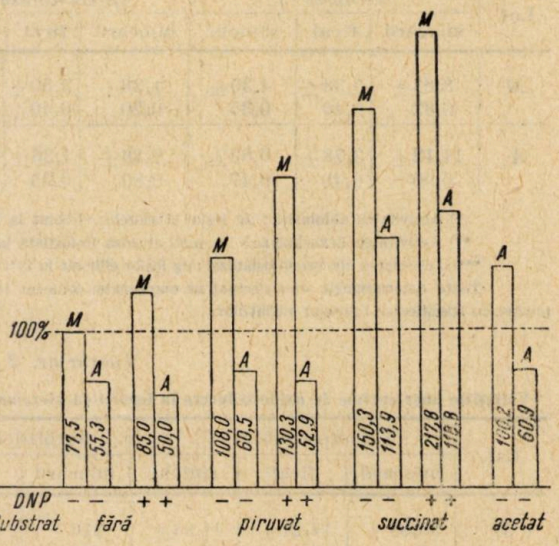
Fig. 1.*a*. — *Consumul de oxigen al secțiunilor de ficat provenite de la iepurii cu ateromatoză experimentală (A) și martori (M).*

În compartimentul principal al vasului Warburg s-au pus 400 mg țesut (secțiuni) și următoarele substanțe exprimate în concentrația finală : KCl $7{,}4 \times 10^{-2}$ M ; tampon fosfat pH 7,4 de concentrația $4{,}8 \times 10^{-3}$ M ; $MgCl_2$ $4{,}8 \times 10^{-4}$ M.

Pentru diferite variante s-a adăugat : piruvat 0,01 M, succinat 0,01 M sau respectiv acetat 0,01 M. De asemenea, în unele probe s-a adăugat 2,4-dinitrofenol (DNP) 10^{-5} M. Cupa centrală a vasului s-a echipat cu alcalii și rolă de hîrtie de filtru. Volumul final : 3 ml. Atmosfera : oxigen. Timpul determinării : 40 de minute. Temperatura de lucru : 25°C.

Coloanele reprezintă variațiile procentuale față de proba martor (respirația secțiunilor țepurilor martori).

Cifrele din coloane : µl oxigen consumați în condițiile descrise.



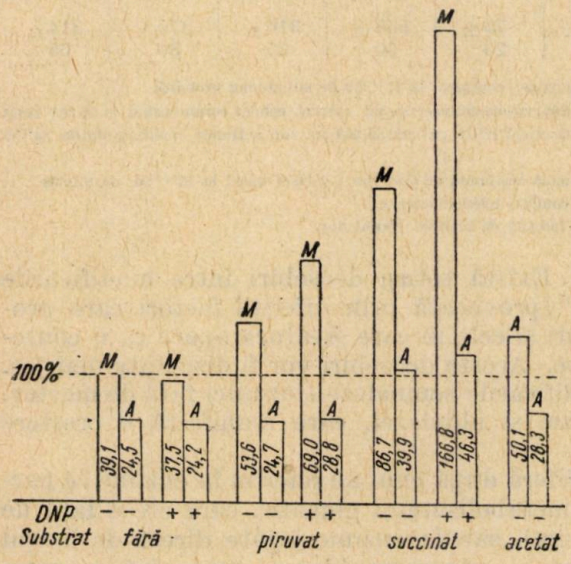


Fig. 1 *b*. — *Consumul de oxigen al omogenatelor de ficat provenite de la iepurii cu ateromatoză experimentală (A) și martori (M).*

În compartimentul principal al vasului Warburg s-a pus o cantitate de omogenat 20% corespunzător la 400 mg țesut. Restul indicațiilor sînt aceleași ca la figura 1 *a*.

consecință scăderea activității enzimelor celulare, concomitent cu scăderea relativă și absolută a conținutului de proteine pe unitatea de greutate.

Din cele expuse rezultă că, cel puțin în cazul ficatului, rolul ce revine ateromatozei și steatozei în provocarea leziunilor biochimice constatate

Tabela nr. 1

Variaţiile unor enzime ale metabolismului glucidic la iepurii cu ateromatoză experimentală (*A*) faţă de martori (*M*)

Lot	Aldolaza *)			Hexochinaza **)			Glucozo-6-fosfataza ***)		
	miocard	ficat	rinichi	miocard	ficat	rinichi	miocard	ficat	rinichi
M	8,63± 0,82	5,38± 0,40	4,30± 0,35	1,36± 0,20	2,50± 0,40	0,87± 0,25	— —	111,3± 15,0	41,1± 8,0
A	11,12± 0,90	3,78± 0,40	6,02± 0,47	2,86± 0,80	1,36± 0,25	1,02± 0,30	— —	82,2± 12,0	78,5± 10,0

*) Activitatea aldolazică : μg fosfor al triozelor eliberat la 38°C/minut mg N proteic.

**) Activitatea hexochinazică : μ moli glucoză fosforilată la 37°C/oră/mg N proteic.

***) Activitatea glucozo-6-fosfatazei : μg fosfor eliberat la 37°C/10 min/mg N proteic.

Toate determinările s-au efectuat pe omogenate, conform tehnicii descrise. Cifrele reprezintă media a 6 determinări, cu specificarea limitelor variaţiilor.

Tabela nr. 2

Variaţiile unor enzime de oxido-reducere la iepurii cu ateromatoză experimentală (*A*) faţă de martori (*M*)

Lot	Citocromoxidaza *)			Sorbitdehidrogenaza **)			CoA ***)	
	miocard	ficat	rinichi	miocard	ficat	rinichi	ficat	rinichi
M	50,39± 6	14,21± 3	41,84± 10	216± 40	586± 40	357± 37	500± 62	309± 47
A	40,69± 5	8,53± 2	41,14± 8	73± 20	565± 50	316± 25	370± 80	314± 65

*) Activitatea citocromoxidazei : μ litri oxigen consumat la 37°C/60 de minute/mg proteină.

**) Activitatea sorbitdehidrogenazei : unităţi spectrofotometrice/ml extract celular corespunzînd la 50 mg ţesut umed. 1 unitate spectrofotometrică = scăderea extincţiei $DPNH_2$ cu 0,001 la 366 mμ sub acţiunea omogenatului la 24°C/5 minute.

***) Coenzima acetilantă (CoA) : μg sulfamidă acetilantă de CoA din 1 g ţesut umed la 37°C/90 de minute.

Determinările s-au efectuat pe omogenate conform tehnicii descrise.

Cifrele reprezintă media a 6 determinări, însoţită de limitele variaţiilor.

de noi este greu de apreciat. Există totuşi deosebiri între modificările semnalate în steatoza „pură" (provocată prin diferiţi factori care produc infiltraţia grasă a ficatului) şi cele în care steatoza apare ca o consecinţă a proceselor ateromatoase. Aceste deosebiri vor fi discutate mai jos.

În cazul rinichiului, modificările semnalate sînt mici faţă de martor, cu excepţia glucozo-6-fosfatazei şi aldolazei, care manifestă o creştere netă (91%, respectiv 40%).

Pentru miocard, datele diferă după cum ne referim la enzime ce participă în faza anoxibiotică a metabolismului glucidic, care cresc faţă de normal (hexochinaza şi aldolaza), sau la enzime legate direct de lanţul respirator (sorbitdehidrogenaza şi citocromoxidaza), care sînt scăzute.

În corelaţie cu cercetările noastre anterioare [17], semnalăm variaţiile enzimatice mai reduse la nivelul rinichilor şi mai accentuate în ficat. Organele cele mai sensibile în această privinţă sînt creierul şi miocardul, organe predilect afectate şi în cursul ateromatozei umane.

DISCUTAREA REZULTATELOR

Din datele prezentate rezultă polimorfismul modificărilor în tabloul enzimatic al țesuturilor examinate la animalele cu ateromatoză experimentală. Dacă nu avem certitudinea de a încrimina tulburările constatate ca factori determinanți în declanșarea afecțiunii, le putem însă acorda fără rezervă un rol favorizant și agravant al procesului patologic, cu atît mai mult cu cît modificările semnalate presistă și după suprimarea regimului aterogen și cu cît media duratei de viață a animalelor cu ateromatoză experimentală este mai scăzută decît a animalelor martor.

Este evident că interpretarea izolată a datelor privitoare la o enzimă sau alta este destul de puțin verosimilă dacă se neglijează rolul constelației endocrine, afectată atît în ateromatoza umană cît și în cea experimentală [20], și care, în mare măsură, controlează nivelul enzimelor tisulare. Din aceste motive, modificările enzimatice constatate la nivelul diferitelor organe, țesuturi sau umori le asociem cu cele endocrine, fiind cunoscut că, în particular, metabolismul glucidic stă sub control plurihormonal.

În acest sens, scăderea hexochinazei hepatice nu este surprinzătoare, fiind probabil determinată de afectarea sistemului endocrin, consecutiv regimului aterogen. Menționăm că în steatozele „pure" (de ex. prin tetraclorură de carbon) hexochinaza, ca și aparatul enzimatic glicolitic interesat în calea Embden-Mayerhof, sînt nemodificate [26], [13]. Răspunsul aparatului tisular pancreatic la administrarea de glucoză [14], precum și testul de toleranță la glucoză-insulină [16], ne-au indicat leziuni similare celor din diabet. O dovadă a legăturii dintre cele două afecțiuni se manifestă și în creșterea importantă a activității G-*6*-P-azei renale, cunoscîndu-se că în diabet este caracteristică disocierea activității hexochinazice hepatice și a G-*6*-P-azei renale [4].

Modificarea aldolazei hepatice este explicabilă atît prin ansamblul tulburărilor echipamentului enzimatic hepatic, cît și ca urmare a stazei anterograde.

Cu totul altfel se prezintă hexochinaza și aldolaza din miocard. Creșterea activității lor pare în contradicție cu explicația dată anterior pentru aceleași enzime din ficat. Cercetările arată că fosforilarea glucozei de către ATP în prezența hexochinazei, privită azi mai mult ca un mecanism de captare, nu depinde în toate țesuturile de insulină : eritrocitele și celulele sistemului nervos central sînt permeabile pentru glucoză și în absența insulinei (de altfel experiențele noastre, care constituie obiectul unei alte note, arată creșterea marcată a hexochinazei creierului în ateromatoza experimentală).

Accelerarea glicolizei din mușchiul cardiac poate fi interpretată ca un fenomen compensator, determinat de tuburările existente în lanțul respirator. Un fapt care atrage atenția este creșterea inegală a celor două enzime din miocard, cu atît mai mult cu cît hexochinaza are un rol limitant în metabolizarea glucozei. Acest fapt se poate explica în sensul că atît calea Embden-Mayerhof cît și calea Dickens-Horecker necesită, ca

primă etapă, fosforilarea glucozei la G-*6*-P. Creşterea relativ mică a aldolazei (cu 29%) faţă de creşterea activităţii hexochinazei (cu 109%) pare a indica utilizarea într-o măsură mai mare a căii pentozo-fosfatice, cale mai economică pentru organism în privinţa consumului de fosfat. Posibilitatea acestui fapt este susţinută de cercetările noastre anterioare [15], care au arătat capacitatea redusă a unor organe principale ale animalelor ateromatoase de a încorpora P radioactiv. Totuşi, explicaţia dată rămîne discutabilă, deoarece activităţile G-*6*-P-dehidrogenazei şi mai ales a fosfogluconat-dehidrogenazei, care se găsesc sub controlul insular, scade mult în diabet [3].

Considerînd că intervenţia mecanismelor endocrine în declanşarea modificărilor biochimice tisulare este bine dovedită, se ridică problema în ce măsură factorii locali, celulari, care reglează în special faza oxidativă a metabolismului intermediar, sînt afectaţi în ateromatoză. Această direcţie de cercetări ne-a fost sugerată de lucrările lui Krebs [10], care au arătat că muşchiul striat şi cardiac prezintă mari variaţii de respiraţie, în dependenţă de starea funcţională a organului, fără a fi un efect direct al hormonilor, deoarece se manifestă şi în suspensiile de muşchi incubate *in vitro* în diferite condiţii. Aceste cercetări atrag atenţia că factorii fiziologici de limitare a respiraţiei celulare sînt ADP, P anorganic şi viteza de regenerare a DPN-ului redus, cu alte cuvinte raportul DPN/$DPNH_2$. De asemenea, un rol important este acordat afinităţii enzimelor piridinice şi flavinice faţă de diferite substraturi.

În cercetările noastre am urmărit consumul de oxigen al secţiunilor (figura 1 *a*) şi omogenatelor (figura 1 *b*) de ficat, în lipsa substratului sau în urma adăugării piruvatului, succinatului şi acetatului, fără sau cu adăugare de agent decuplant (2,4-dinitrofenol = DNP). Utilizarea în paralel a secţiunilor şi omogenatelor am considerat-o utilă, deoarece nu întotdeauna rezultatele obţinute prin cele două metode sînt identice.

Rezultatele obţinute arată o scădere apreciabilă a consumului de oxigen la animalul ateromatos, atît pe secţiunile cît şi pe omogenatele de ficat. Această constatare primeşte o importanţă mai mare prin stabilirea factorilor care limitează transportul de electroni la animalul ateromatos, faţă de martor. După cum se vede din figurile 1 *a* şi 1 *b*, adăugarea piruvatului la ficatul provenit de la animalul martor duce la creşterea consumului de oxigen cu 39% pe secţiuni, respectiv 38% pe omogenate. În prezenţa DNP-ului (decuplant al fosforilării oxidative), adăugarea piruvatului măreşte respiraţia cu 53% pe secţiuni, respectiv cu 84% pe omogenate. La animalele ateromatoase, piruvatul măreşte consumul de oxigen cu numai 10% pe secţiuni, efectul fiind nul pe omogenate. În prezenţa DNP-ului, piruvatul nu modifică practic consumul de oxigen la animalul ateromatos.

Rezultatele noastre indică faptul că, pe lîngă mecanismele de acţiune ale DNP-ului [2], [23] şi pe lîngă factorii fiziologici de limitare a respiraţiei celulare menţionaţi, există probabil în ateromatoză şi alţii. Aceşti fac-

tori, în ceea ce privește oxidarea piruvatului, care este însoțită de o serie de procese enzimatice, ar fi, pe baza datelor noastre, următorii :

— esterii tiaminfosforici, care ne apar modificați în ateromatoza clinică și experimentală [18];

— coenzima acetilantă (Co A), scăzută în ficat (cu 26%) la animalele ateromatoase, față de martor;

— limitarea vitezei de regenerare a DPN-ului, ilustrată de altfel și prin lipsa de stimulare a respirației la animalul ateromatos în prezența dinitrofenolului.

— un rol important îl acordăm acidului oxalacetic și, mai ales, „enzimei de condensare a citratului", deoarece nici catabolizarea acetatului nu se petrece la același nivel ca la martori.

În privința oxidării succinatului, intermediar al ciclului tricarboxilic rezultatele prezintă unele particularități. La martori, succinatul mărește consumul de oxigen de aproape două ori, atît pe secțiuni cît și pe omogenate. Adăugarea de DNP mărește consumul de oxigen cu 156% pe secțiuni, respectiv 343% pe omogenate. Pe ficatul provenit de la animalul ateromatos, succinatul mărește consumul de oxigen aproape în aceeași măsură ca și la martor, dar adăugarea de DNP în acest caz stimulează foarte puțin consumul de oxigen.

Explicarea acestui fenomen ridică o serie de probleme care nu pot fi rezolvate în limita materialului experimental prezentat; menționăm că în această privință lipsesc date în literatură. Stimularea oxidărilor celulare în prezența succinatului la animalul ateromatos, cu valori apropiate de ale martorilor în absența DNP-ului, poate fi considerată ca o ocolire a fazei de oxidare în care intervin enzimele piridinice, știut fiind că dehidrogenarea succinatului are loc sub influența unei enzime care conține ca parte activă un flavindinucleotid (FAD) [22]. Se poate astfel conchide că etapa flavinică a lanțului respirator nu constituie un factor de limitare a oxidărilor din ficatul ateromatos. Efectul diferit al DNP-ului la cele două loturi de animale ridică problema unui alt factor de limitare, deocamdată neidentificat.

CONCLUZII

1. Aspectul diferit al tabloului enzimatic (aldolaza, hexochinaza, glucozo-*6*-fosfataza, citocromoxidaza, sorbitdehidrogenaza, coenzima acetilantă) în organele studiate (miocard, ficat, rinichi) se datorește gradului variabil de afectare a acestor organe în ateromatoza experimentală și posibilităților diferite de compensare. Semnalăm în primul rînd miocardul, în care diminuarea accentuată a oxidărilor duce la accentuarea proceselor de glicoliză.

2. Dintre factorii de limitare a glicolizei hepatice, un rol important revine sistemului endocrin, în special insular, afectat în ateromatoză. În această privință analogia cu diabetul este un fapt incontestabil deși apar diferențe mai ales în privința utilizării căii pentozo-fosfatice.

3. Factorii de limitare a respiraţiei omogenatelor şi secţiunilor de ficat în ateromatoză se referă atît la mecanismele de decarboxilare, a piruvatului, cît mai ales la condensarea acetatului la citrat. Un rol particular trebuie acordat enzimelor piridinice şi citocromoxidazei, ultima fază în transferul electronilor pe oxigenul molecular.

Prezentată la redacţie
la 28 septembrie 1963

Catedra de biochimie a I.M.F. Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. BÁLINT P., HEGEDUS A., *Klinikai Láboratoriumi Diagnostika*, ed. a II-a, Müvelt Nép, Budapesta, 1955, p. 341.
2. BOYER P. D., SUELTER C. H., DE LUCA M., PETER J. B., DEMPSEY M. E., *On the nature of intermediates in the oxidative phosphorylation process, în V^th International Congress of Biochemistry*, Moscow, 10—16 aug. 1961, Symp. V, preprint no. 177.
3. DIKENS F., GLOCK G., MC LEAN P., *Ciba Found. Symp. on the Regulation of Cell Metabolism*, Churchill, Londra, 1959, p. 150—187.
4. EKREM SHERIF EGELI, Med. internă, **11**, *3*, 373—387 (1959).
5. FLEURY P., *Fiches Techniques de Chimie biologique*, edit. Vega, Paris, 1955.
6. GERLACH U., Klin. Wschr., 37, *2*, 93 (1959).
7. GLICK D., *Methods of Biochemical Analysis*, edit. Interscience Publ. New York, 1955, vol. 2.
8. HERBERT D., GORDON H., SUBRAHMANYAN I., GREEN D. E., Biochem. J., **34**, 1108—1123 (1940).
9. KITTINGER G. W., WEXLER B. C., MILLER B. F., *Metabolisme de la paroi vasculaire*, în *Thèses du IV Congrès Internat. d'Angéiologie*, Praha, 4—9 sept. 1961, p. 107.
10. KREBS H., *Ciba Found. Symp. on the Regulation of Cell Metabolism*, edit. Churchill, Londra, 1939, p. 1—11.
11. KRCLEK A., JANNOUSEK V., SERAK L., *Ciba Found. Symp. on the Regulation of Cell Metabolism*, edit. Churchill, Londra, 1959, p. 108.
12. KUSKO V. M., KULNEV B. A., CHOVASKAIA A., *Ciba Found. Symp. on the Regulation of Cell Metabolism*, edit. Churchill, Londra, 1959, p. 108.
13. MAFTEI E., BÎRZU O., BÎCLEŞEANU C., CĂTANĂ R., Comunicare la Conferinţa interregională de fiziologie, Sinaia (1962).
14. MANTA I., BEDELEANU D., MUREŞAN L., GORUN V., St. cercet. biochimie, **4**, *1*, 31—43 (1961).
15. MANTA I., BEDELEANU D., LAZĂR T. C., MUREŞAN LETITIA, St. cercet. biochimie, **4**, *1*, 45—48 (1961).
16. MANTA I., BEDELEANU D., LAZĂR T. C., GORUN V., IONESCU D., Fiziologia normală şi patologică, **8**, *4*, 321—327 (1962).
17. MANTA I., BEDELEANU D., Revista medicală (Tg. Mureş), **VIII**, *2*, 210—217 (1962).
18. MANTA I., GORUN V., ISPAS O., Comunicare la Soc. de fiziologie, Cluj (1963).
19. MOGA A., VLAICU R., PITEA P., BUTNARU J., COFARU D., MISSITS P., MACAROVICI F., St. cercet. medicină (Cluj), **13**, *1*, 106—114 (1962).
20. MOGA A. et al. *Probleme de actualitate în medicină*, Edit. medicală, Bucureşti, 1961, p. 130—158.
21. PIGAREVA Z. D., CETVERIKOV D. A., Biohimiia, **15**, *6*, 517—522 (1950).
22. REDFEARN E. R., *Studies on the posible function of Ubiquinone (Coenzime Q) in electron transport and oxidative phosporylation*, în *Vth International Congress of Biochemistry*, Moscow, 10—16 aug. 1961, Symp. V, preprint nr. 133.

23. SLATER E. C., *Mechanism of uncoupling of oxidative phosphorylation by nitrophenols*, în *Vth International Congress of Biochemistry*, Moscow, 10—16 aug. 1961. Symp. V. preprint nr. 129.
24. SWANSON M. A., *Methods in Enzymologie*, sub redacţia S. D. Colowick and N. O. Kaplan, Academic Press, New York, 1955, vol. 2, p. 541.
25. THOMSON R. H. S., KING E. J., *Biochemical disordres in human diseases*, Edit. Churchill, Londra, 1957, p. 512.
26. VILLELA GILBERTO G., An. Asoc. Quim. Argent., **49**, *1*, 5—21 (1961).
27. ZAHARIN I. L., Biohimiia, **16**, *6*, 562—566 (1951).

INTRODUCEREA SUBSTANȚELOR ÎN PLANTE PRIN METODA CAPILARĂ*)

DE

I. D. POPPOFF și D. I. GHEORGHIEV

Pentru introducerea diferitelor substanțe în organismul vegetal s-au folosit diverse metode : a) introducerea substanțelor în sol ; b) îmbibarea semințelor cu soluția apoasă a substanței respective ; c) pulverizarea frunzelor cu diferite substanțe sub formă de praf sau soluție ; d) vacuum infiltrația (Kursanov) [1] etc.

Bazîndu-se pe constatările făcute de I. M. Felber [2], E. Macovschi [3] a elaborat o metodă specială, „metoda capilară", care permite introducerea soluțiilor diferitelor substanțe în plante și, în același timp, dă posibilitatea determinării atît a cantității de soluție pătrunse, cît și a vitezei de pătrundere.

Avînd în vedere larga perspectivă pe care metoda capilară o oferă pentru rezolvarea diferitelor probleme importante din domeniul biochimiei și fiziologiei vegetale, am considerat că studiul procesului de pătrundere și al modului de răspîndire a soluțiilor introduse în plante prin această metodă prezintă un anumit interes. De aceea, am efectuat experiențe de introducere a soluțiilor de coloranți și fosfor radioactiv în plante de tomate cu ajutorul metodei capilare, urmărind nivelul pînă la care ajung aceste soluții, precum și căile prin care ele se răspîndesc în plante. Menționăm că E. Macovschi, V. Frunzeti și S. Rădulescu [4] au cercetat modul de translocare a soluțiilor de pironină și albastru de metilen în plante de balsamine și tomate și au elaborat, pe baza constatărilor făcute, „teoria adsorbtivă" a migrării substanțelor în plante. Noi am lucrat cu plante de tomate din soiul „Zarea × Komet", în vîrstă de 70—75 de zile, care aveau 8—10 frunze și înălțimea de 40—60 cm. Tuburile de sticlă în formă de U, (fig. 1), care conțineau soluțiile respective, erau fixate pe tulpinile plantelor cu ajutorul unor benzi de leucoplast. În tubușoare se introducea fitilul de bumbac al cărui capăt liber era tras transversal prin tulpina plantelor și era apoi tăiat de cealaltă parte a tulpinii, pentru a nu veni în contact cu atmosfera. Drept colorant am utilizat o soluție apoasă de pironină 0,2%. Pentru compararea modului de migrare a coloranților în plantele de tomate, prin metoda capilară, cu modul de migrare a coloran-

*) Lucrarea a fost tradusă din limba rusă de Corina Iordache, cercetător principal la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.

tului pătruns direct în vasele conducătoare ale tulpinii, s-au introdus în soluția de colorant plante ale căror rădăcini au fost îndepărtate. Timpul de introducere a colorantului a fost de 24 de ore, apoi tulpinile erau secționate transversal, în porțiuni de 0,5 cm. S-a constatat că, la plantele la

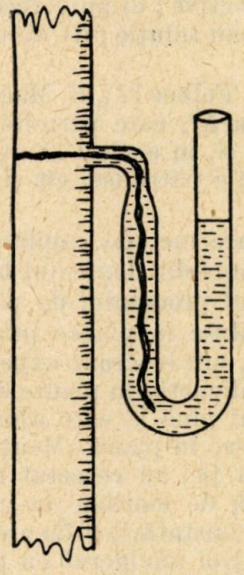


Fig. 1. — Tuburi de sticlă îndoite în U, fixate la tulpina plantei, folosite pentru introducerea substanței cercetate.

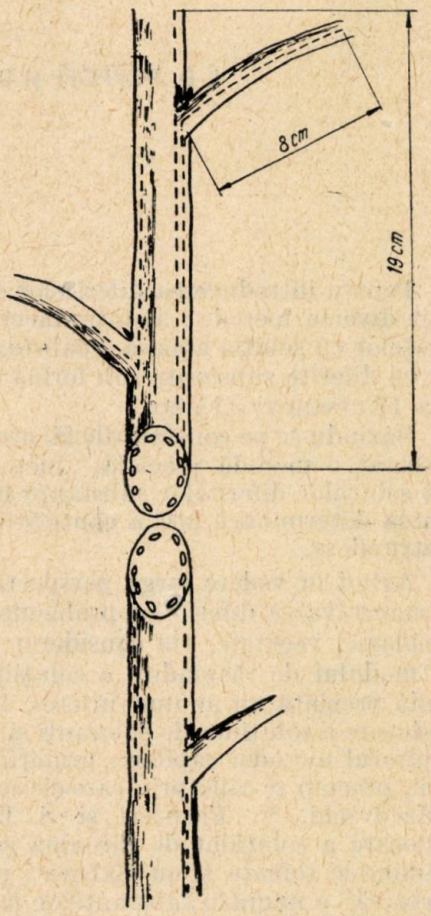


Fig. 2. — Răspîndirea pironineiintrodusă prin metoda capilară în tulpina plantei de tomate.

care soluția de colorant s-a introdus prin metoda capilară, colorantul a migrat atît deasupra locului de introducere a fitilului, cît și dedesubt, aproximativ pe o distanță care nu depășea 20 cm ; numărul de vase colorate era de 2—3 deasupra locului de pătrundere a fitilului și 1—2 în partea de dedesubt (fig. 2). La plantele la care soluția de colorant s-a introdus direct prin vasele conducătoare ale tulpinii, s-a observat că toate

fasciculele conducătoare erau colorate în roșu pe o înălțime de 40—50 cm ; de asemenea, vasele conducătoare ale peţiolurilor frunzelor crau colorate.

De aici rezultă că soluția colorată introdusă prin metoda capilară se răspîndește doar prin acele fascicule de vase conducătoare care au fost străbătute de fitilul introdus.

Pentru a doua serie de experiențe am folosit fosfat monopotasic radioactiv. Soluția acestei sări, care conținea cîte 20 microcurie ^{32}P pentru

Tabela nr. 1

Radioactivitatea în impulsuri pe minut la 1 g frunze uscate, la plante de tomate în care s-a introdus soluția de KH_2PO_4 cu fosfor radioactiv

Varianta cu un fitil		Varianta cu două fitiluri	
Imp/min.	% din radioactivitatea totală	Imp./min.	% din radioactivitatea totală
27 300	25,6	21 780	16,3
20 290	19,0	19 380	14,5
19 440	18,2	17 980	14,1
18 400	17,4	14 680	11,0
7 280	6,9	12 100	8,9
5 200	4,9	11 720	8,8
5 140	4,9	9 640	7,2
2 040	1,9	9 300	7,0
820	0,7	9 160	6,8
560	0,5	7 480	5,4
Radioactivitatea totală a frunzelor (în imp. min.)	106.470	133.220	

fiecare plantă, s-a introdus în unele plante printr-un singur fitil (varianta *A*), iar în altele prin două fitile, montate la mică distanță unul de altul, în așa fel încît fitilele să străbată tulpina pe direcții perpendiculare (varianta *B*). Introducerea soluției a durat 24 de ore, apoi fiecare frunză se detașa de pe tulpină, se usca la 110°C, se mojara pînă la obținerea unui praf fin și apoi i se determina radioactivitatea. Datele din tabela nr. 1 reprezintă radioactivitatea frunzelor în impulsuri pe minut, începînd de la locul de introducere a soluției, spre vîrf. Se constată că fosforul radioactiv introdus prin două fitiluri este cu aproximativ cu 30% mai mare decît cel pătruns în plante printr-un singur fitil. În afară de aceasta, fosforul introdus în plantă prin două fitiluri se răspîndește mult mai uniform decît în cealaltă variantă. Aceasta se vede deosebit de clar din compararea radioactivității maxime și minime a frunzelor din ambele variante.

La varianta *A*, radioactivitatea maximă a frunzelor atinge 27 300 imp./min., pe cînd radioactivitatea minimă este de numai 560 imp./min. Dacă socotim radioactivitatea maximă egală cu 100, atunci raportul dintre radioactivitata maximă și cea minimă este de 100 :2,55.

La varianta *B*, radioactivităţile maximă şi minimă sînt egale cu respectiv 21 780 şi 7 480 imp./min. Raportul în acest caz este 100 : 34,3.

Din distribuţia procentuală a radioactivităţii totale în frunze, se constată că în timp ce în prima variantă (*A*) diferenţa dintre frunze (de exemplu, dintre frunzele 4 şi 5) este de 10,5%, în cea de a doua variantă (*B*) această diferenţă se micşorează şi atinge abia 2,1%. În afară de aceasta, raportul radioactivităţii maxime şi minime a frunzelor este de 25,6 : 0,5 în prima variantă, iar în cea de două variantă este de 16,5 :5,4 .

În concluzie, migrarea şi distribuţia substanţei introduse în organismul vegetal prin metoda capilară depinde de natura substanţei introduse şi de numărul fitilurilor prin care se introduce soluţia substanţei în plantă. S-a constatat că pironina, introdusă printr-un singur fitil, se deplasează încet şi numai prin 2—3 vase conducătoare, iar soluţia de fosfor radioactiv se regăseşte în toate frunzele plantelor de tomate, distribuţia ei fiind mai uniformă atunci cînd soluţia se introduce prin două fitiluri, montate perpendicular, ajungînd în mai multe vase conducătoare.

De aici urmează că pentru utilizarea cu succes a metodei capilare trebuie să se ţină seama de capacitatea de deplasare şi acumulare a substanţei în plantă şi, în funcţie de aceasta, să se stabilească modalitatea de introducere a soluţiei respective.

Prezentată la redacţie
la 1 august 1963

Secţia de biochimie a Institutului pentru cultura plantelor al Academiei de ştiinţe agricole, Sofia, R.P. Bulgaria

BIBLIOGRAFIE

1. КУРСАНОВ А. Л., *Обратимое действие ферментов в живой растительной клетке*, Биохимия *1*, 269 (1940).
2. FELBER I. M., *Direct introduction of chemical substances into herbaceous plants* Science, **106**, 251 (1947).
3. MACOVSCHI E., *Die Verwendung der Kapillarmethode zur Einführung chemischer und biologischer Stoffe in den Pflanzenkörper*, Preslia, **30**, 252 (1958).
4. MACOVSCHI E., FRUNZETI V., RĂDULESCU S., *Migrarea pironinei şi albastrului de metilen prin tulpini de balsamine şi tomate*, St. cercet. biochimie, **4**, *1*, 23 (1963).

INFLUENȚA UNOR SUBSTANȚE CHIMICE FOLOSITE ÎN INDUSTRIA ALIMENTARĂ ASUPRA ACTIVITĂȚII ENZIMATICE A FICATULUI

DE

A. SPORN și ILEANA DINU *)

Dezvoltarea toxicologiei alimentare, individualizarea ei în cadrul toxicologiei generale, integrarea ei în igiena alimentației sînt în mare măsură condiționate de elaborarea unei metodologii proprii. O asemenea metodologie trebuie să se bazeze pe metode capabile să sesizeze nocivitatea dozelor mici de substanțe chimice în general și influența lor asupra metabolizării alimentelor în particular. Ținînd seama de rolul pe care-l joacă enzimele în metabolism și de sensibilitatea ridicată a testelor enzimatice, rezultă că aceste teste pot furniza date deosebit de utile în aprecierea toxicității adjuvanților alimentari.

Pornind de la aceste premise, în cadrul cercetărilor noastre cu privire la toxicitatea aromatizanților alimentari am urmărit și modificările care survin în activitatea enzimatică a ficatului, sub influența acestor substanțe. Prin aceasta am căutat să rezolvăm unele probleme de interes teoretic, practic și metodologic, adică să obținem date cu privire la mecanismul de acțiune al acestor substanțe, să stabilim mai precis dozele maxime admisibile și să precizăm rolul testelor enzimatice în toxicologia alimentară.

METODA DE CERCETARE

Cercetările s-au efectuat pe 32 de șobolani albi, de vîrstă și greutate apropiată, împărțiți în 4 loturi. Animalele au primit timp de 8 săptămîni o rație sintetică ce conținea 11 % proteine. Loturile experimentale au primit o dată la 2 zile, *per os*, 0,1 ml ulei ce conținea 10 mg acetat de butil sau metilnaftilcetonă, respectiv un amestec de alfa și beta iononă. La sfîrșitul experienței animalele au fost sacrificate, determinîndu-se în omogenatul hepatic : succin-dehidrogenaza, aldolaza, transaminaza glutamic-aspartică, transaminaza glutamic-alaninică, acidul dezoxiribonucleic și conținutul de azot.

Succin-dehidrogenaza s-a determinat după metoda lui Kun și Abood [2], folosind ca activator acidul adenozin-trifosforic.

Aldolaza s-a determinat după metoda lui Tovarnițki și Voluiskaia [3].

Transaminaza glutamic-aspartică și transaminaza glutamic-alaninică s-au determinat după metoda lui Bruyet și colab. [1].

---

*) La lucrare a participat și Mihaela Andrei.

Conţinutul în acid dezoxiribonucleic s-a determinat după metoda lui Webb şi Lewy [4].

Rezultatele determinărilor enzimatice s-au raportat la greutatea ficatului umed, la conţinutul în azot al ficatului, la mg de acid dezoxiribonucleic şi la greutatea corporală la sacrificare.

REZULTATE OBŢINUTE

Media greutăţii corporale a animalelor la sacrificare a oscilat între 163 şi 176 g, diferenţele între loturi nefiind semnificative din punct de vedere statistic (tabela nr. 1).

Greutatea ficatului, exprimată în valori absolute, a oscilat între 5,24 şi 6,22 g, iar în valori relative (la 100 g greutate corporală) între 3,21 şi 3,52 g, diferenţele între loturi nefiind semnificative statistic (tabela nr. 1).

Conţinutul de azot al ficatului, exprimat în valori absolute, a oscilat între 215 şi 246 mg, iar în valori relative între 131 şi 140 mg%. Nici în acest caz nu s-au înregistrat diferenţe semnificative între loturi (tabela nr. 1).

Conţinutul de acid dezoxiribonucleic, raportat la greutatea ficatului, a oscilat între 2,66 şi 2,92 gama la mg, raportat la azotul hepatic între 64,7 şi 71,9 gama la mg, iar la greutatea corporală între 8 967 şi 9 424 gama la 100 g greutate corporală. Diferenţele între loturi nu au fost semnificative din punct de vedere statistic (tabela nr. 3).

Activitatea succin-dehidrogenazei este apropiată la toate loturile, neexistînd practic diferenţe faţă de lotul martor (tabela nr. 2). Faptul că mediile loturilor sînt atît de apropiate indică nu numai că substanţele cercetate nu influenţează activitatea acestei enzime, dar şi că rezultatele sînt perfect reproductibile. Astfel, raportate la mg de ficat umed, valorile medii pentru 3 loturi sînt de 1,07, iar pentru un lot de 1,14. Această concluzie este confirmată şi de faptul că eroarea standard a valorilor medii este foarte mică (sub 5%).

Activitatea aldolazei se situează la valori apropiate, diferenţele între loturi nedepăşind 0,08 unităţi (tabela nr. 4). Eroarea standard este şi mai scăzută decît în cazul succin-dehidrogenazei (sub 4% la 3 loturi).

Activitatea transaminazei glutamic-aspartice nu este influenţată de aromatizanţii alimentari. Valorile medii ale loturilor sînt foarte apropiate, diferenţele faţă de lotul martor nedepăşind 6 micromoli piruvat format la 1 g de ficat umed (tabela nr. 5).

Activitatea transaminazei glutamic-alaninice este foarte apropiată la toate loturile, diferenţele faţă de lotul martor nedepăşind 5 micromoli piruvat format. Eroarea standard se situează la valori mici (sub 1% la 2 loturi şi sub 3% la toate loturile) în cazul raportării rezultatelor la greutatea ficatului umed (tabela nr. 6).

Rezultatele obţinute arată deci că în condiţiile noastre experimentale aromatizanţii alimentari nu au produs nici o modificare a activităţii enzimelor hepatice cercetate. Reiese de asemenea perfecta reproductibilitate a rezultatelor, valorile medii fiind foarte apropiate iar erorile standard mici.

Tabela nr. 1

Greutatea corporală, greutatea şi conţinutul în azot al ficatului

Loturile	Greutatea corporală					Greutatea ficatului						Conţinutul în azot al ficatului					
	Iniţială		La sacrificare			În grame			În g/100g. greut/corp.			În miligrame			mg/100 g greut. corp.		
	Media	E.S.*	Media	E.S.	P**	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
Martor	56,8	0,6	163,0	10,4	—	5,24	0,38	—	3,21	0,09	—	215	19,2	—	131	4,7	—
Ac. butil	56,8	0,6	176,0	11,0	>0,05	6,22	0,47	>0,05	3,52	0,15	>0,05	246	22,3	>0,05	140	8,8	>0,05
Metil-naftil-cetonă (M.N.C.)	56,4	0,9	164,0	6,9	>0,05	5,57	0,21	>0,05	3,43	0,14	>0,05	223	7,8	>0,05	138	5,2	>0,05
Iononă	56,9	0,7	174,0	11,5	>0,05	5,58	0,29	>0,05	3,24	0,12	>0,05	232	20,4	>0,05	137	6,0	>0,05

* E.S. = eroare standard. ** P = testul Pearson.

Tabela nr. 2

Activitatea succin-dehidrogenazei hepatice (în gama formazan format în 15 minute)

Loturile	La mg. ficat umed			La mg azot hepatic			la mg ac. nucleici			la 100 g greut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	1,07	0,05	—	26,0	1,1	—	361,6	10,8	—	3 659	346	—
II. Ac. butil	1,14	0,05	>0,05	28,6	1,0	>0,05	413,5	24,0	>0,05	4 070	258	>0,05
III. M.N.C.	1,07	0,06	>0,05	26,9	1,9	>0,05	406,3	29,5	>0,05	3 666	242	>0,05
IV. Iononă	1,07	0,07	>0,05	26,2	3,8	>0,05	406,5	34,4	>0,05	3 471	304	>0,05

Tabela nr. 3

Conţinutul de acid dezoxiribonucleic al ficatului

Loturile	La mg ficat umed			La mg N. hepatic			La 100 g greut. corp		
	media	E.S.	P.	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	2,92	0,18		71,9	4,2		9 424	484	
II. Acetat de butil	2,66	0,12	>0,05	66,8	4,9	>0,05	9 534	637	>0,05
III. M.N.C.	2,66	0,08	>0,05	67,0	4,8	>0,05	9 119	432	>0,05
IV. Iononă	2,66	0,14	>0,05	64,7	5,0	>0,05	8 967	636	>0,05

Lipsa modificărilor în activitatea enzimatică a ficatului poate fi explicată prin faptul că aromatizanţii alimentari cercetaţi fie că nu sînt toxici în dozele administrate, fie că afectează alte verigi metabolice. Pentru a elucida această problemă am modificat condiţiile experimentale, agravîndu-le şi introducînd totodată loturi suplimentare de martori pozitivi, adică substanţe cu toxicitatea stabilită în cercetările noastre anterioare.

Cercetările s-au efectuat pe 56 şobolani albi tineri, din aceeaşi generaţie şi de greutate şi vîrstă apropiată, împărţită în 7 loturi, după cum urmează : lotul I — martor ; lotul II — acetat de butil ; lotul III — metil-naftil-cetonă ; lotul IV — iononă ; lotul V — galat de etil ; lotul VI — acid salicilic ; lotul VII — amestec de Pb, Cu, Sn şi As.

Animalele au primit o raţie sintetică ce conţinea 11% proteine, iar ca sursă de glucide amidon de grîu. Această raţie a determint o încetare a creşterii şi o scădere a ingestei. După 3 săptămîni, cînd greutatea a scăzut cu aproximativ 10 g, s-a înlocuit amidonul de grîu cu amidon de porumb, restabilindu-se astfel creştera normală.

Aromatizanţii alimentari s-au administrat *per os*, o dată la două zile, cîte 10 mg la 0,1 ml ulei. Galatul de etil s-a adăugat în uleiul utilizat la pregătirea raţiei sintetice, în concetraţie de 0,75 g la 100 g ulei. Acidul salicilic s-a adăugat la amestecul de săruri, în concentraţie de 1 g la kg mîncare. Plumbul, cuprul, staniul şi arsenul s-au adăugat la amestecul de săruri în următoarele concentraţii la 1 kg de mîncare : azotat de plumb 0,1 mg, sulfat de cupru 0,1 g, clorură stanoasă 0,2 g şi trioxid de arsen 0,5 mg.

După 8 săptămîni de administrare a substanţelor cercetate, animalele s-au sacrificat, determinînd-se în omogenatul hepatic aceleaşi enzime.

Greutatea corporală a animalelor a fost la sfîrşitul experienţei mai scăzută la loturile care au primit substanţe chimice, faţă de lotul martor. Diferenţele sînt semnificative din punct de vedere statistic numai la loturile ce au primit acetat de butil, metil-naftil-cetonă şi galat de etil (tabela nr. 7).

Greutatea ficatului, atît în valori absolute cît şi relative (la 100 g greutate corporală), nu înregistrează modificări semnificative din punct de vedere statistic la nici un lot (tabela nr. 7).

Conţinutul în azot al ficatului prezintă o scădere semnificativă doar la lotul ce a primit acetat de butil. Raportat la greutatea corporală, conţinutul de azot al ficatului este mai crescut la lotul ce a primit galat de etil, la celelalte loturi diferenţele nefiind semnificative din punct de vedere statistic (tabela nr. 7).

Conţinutul de acid dezoxiribonucleic nu prezintă diferenţe faţă de lotul martor în cazul cînd rezultatele se raportează la greutatea ficatului umed sau la azotul hepatic. Raportat la greutatea corporală, conţinutul

Tabela nr. 4

Activitatea aldolazei hepatice (în unități)

Loturile	La mg ficat umed			Le mg azot hepatic			La mg ac. nucleici			La 100 g grut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	1,16	0,04	—	28,6	1,6	—	401,5	25,4	—	3 736	151	—
II. Ac. Butil	1,09	0,04	>0,05	26,5	2,0	>0,05	410,2	19,5	>0,05	3 884	240	>0,05
III. M.N.C.	1,11	0,02	>0,05	28,2	0,9	>0,05	418,6	14,3	>0,05	3 798	146	>0,05
IV. Iononă	1,08	0,08	>0,05	26,1	2,0	>0,05	412,7	21,0	>0,05	3 503	114	>0,05

Tabela nr. 5

Activitatea transaminazei glutamic-aspartică (în micromoli piruvatformat)

Loturile	La g ficat umed			Le mg azot hepatic			La mg ac. nucleici			La 100 g greut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	87	3,6	—	2,13	0,1	—	30,1	2,1	—	279	12,3	—
II. Ac. butil	89	3,8	>0,05	2,22	0,1	>0,05	33,4	1,1	> 0,05	318	16,8	>0,05
III. M.N.C.	82	4,9	>0,05	2,13	0,1	>0,05	30,8	2,1	> 0,05	282	22,0	>0,05
IV. Iononă	93	2,2	>0,05	2,27	0,1	>0,05	33,5	1,4	> 0,05	302	11,9	>0,05

de acid dezoxiribonucleic este semnificativ mai crescut la loturile ce au primit amestec de alfa- și beta-ionină, respectiv amestec de plumb, cupru, staniu și arsen (tabela nr. 8).

Activitatea succindehidrogenazei hepatice se caracterizează prin valori medii care oscilează între 1,06 și 1,31 gama formazan redus în 15 minute la mg de ficat umed, între 28,2 și 32,6 gama la mg azot hepatic, între 422,3 și 509,5 gama la mg de acid dezoxiribonucleic și între 4033—4710 gama la 100 g greutate corporală (tabela nr. 9).

În majoritatea cazurilor, valorile înregistrate la loturile experimentale sînt mai scăzute decît la lotul martor. Diferențele între loturi nu sînt însă semnificative din punct de vedere statistic (tabela nr. 9).

Activitatea aldolazei hepatice este crescută la toate loturile care au primit substanțe chimice. Din punct de vedere statistic creșterea nu este însă semnificativă la toate loturile, existînd totodată și unele diferențe în funcție de modul de raportare a rezultatelor.

La lotul care a primit acetat de butil se înregistrează o creștere semnificativă a activității aldolozei numai cînd rezultatele sînt raportate la mg de ficat umed. În cazul metil-naftil-cetonei creșterea activității aldozei este semnificativă atît în cazul raportării la greutatea ficatului umed cît și la greutatea corporală. La lotul care a primit amestec de alfa- și beta ionină, diferențele față de lotul martor sînt puternic semnificative în cazul cînd raportarea se face la greutatea ficatului (P este mai mic de 0,003), la mg acid dezoxiribonucleic (P mai mic de 0,01) și la greutatea corporală (P mai mic de 0,001) (tabela nr. 10).

Galatul de etil determină o creștere a activității aldolazei, semnificativă cînd raportarea se face la greutatea ficatului, la mg de acid dezoxiribonucleic (P mai mic de 0,003) și la greutatea corporală (P mai mic de 0,001). În cazul acidului salicilic, diferențele sînt semnificative numai cînd rezultatele sînt raportate la mg acid dezoxiribonucleic și la greutatea corporală. La administrarea concomitentă a plumbului, cuprului, staniului și arsenului, creșterea activității aldolazei este net semnificativă cînd raportarea se face la greutatea ficatului umed (P este mai mic de 0,003), la mg de acid dezoxiribonucleic și la greutatea corporală (P mai mic de 0,01).

Activitatea transaminazei glutamic-aspartice este mai scăzută față de lotul martor la toate loturile experimentale. Din punct de vedere statistic această scădere este însă semnificativă numai la unele loturi și la un anumit mod de exprimare a rezultatelor (tabela nr. 11).

În cazul acetatului de butil, scăderea activității transaminazei glutamic-aspartice este net semnificativă, indiferent de modul de exprimare a rezultatelor. La lotul care a primit amestec de alfa și beta-iononă, diferențele sînt semnificative numai în cazul cînd raportarea rezultatelor se face la greutatea ficatului și la mg de acid dezoxiribonucleic. Administrarea concomitentă a plumbului, cuprului, staniului și arsenului determină o scădere a activității transaminazei glutamic-aspartice, semnificativă numai cînd rezultatul se raportează la greutatea ficatului și la mg acid dezoxiribonucleic.

Tabela nr. 6

Activitatea transaminazei glutamic alaninică (în micromoli piruvat format)

Loturile	La g ficat umed			La mg azot hepatic			La mg acizi nucleici			La 100 g greut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	133	1,1	—	3,27	0,1	—	46,3	2,8	—	429	14,2	—
II. Ac. butil	133	0,9	>0,05	3,27	0,1	>0,05	50,7	2,6	>0,05	479	22,9	>0,05
III. M.N.C.	128	3,6	>0,05	3,26	0,05	>0,05	48,1	1,5	>0,05	441	21,7	>0,05
IV. Iononă	135	2,1	>0,05	3,34	0,2	>0,05	51,7	2,9	>0,05	439	18,5	>0,05

Tabela nr. 7

Greutatea corporală, greutatea şi conţinutul în azot al ficatului

Loturile	Greutatea corporală					Greutatea ficatului						Conţinutul în azot al ficatului					
	Iniţială		La sacrificare			În grame			În g/100g greut.corp.			În miligrame			În mg/100 g gr. corp.		
	Media	E.S.	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	44,8	1,08	132,7	6,2	—	4,5	0,32	—	3,3	0,13	—	198,3	16,0	—	147,0	11,6	—
II. Ac. butil	44,8	1,06	118,0	2,8	<0,05	4,0	0,19	>0,05	3,3	0,09	>0,05	162,5	5,7	<0,05	138,0	5,2	>0,05
III. M.N.C.	44,8	1,06	111,0	4,4	<0,01	4,4	0,22	>0,05	3,9	0,13	>0,05	176,0	7,0	>0,05	155,0	4,1	>0,05
IV. Iononă	44,8	1,06	114,5	8,1	>0,05	4,8	0,37	>0,05	4,1	0,16	>0,05	185,8	7,3	>0,05	149,6	8,9	>0,05
V. Galat etil	44,8	1,12	117,0	4,1	<0,05	5,2	0,26	>0,05	4,4	0,16	>0,05	210,7	16,6	>0,05	180,0	9,8	>0,05
VI. Acid salicilic	44,7	1,27	126,8	5,2	>0,05	4,9	0,13	>0,05	3,8	0,13	>0,05	174,8	16,5	>0,05	139,6	18,4	>0,05
VII. Pb, Cu, Sn şi As.	44,8	1,10	123,0	6,9	>0,05	4,8	0,42	>0,05	3,8	0,15	>0,05	204,7	20,3	>0,05	164,8	10,4	>0,05

Tabela nr. 8

Conținutul în acid dezoxiribonucleic al ficatului

Loturile	La mg ficat umed			La mg azot hepatic			La 100 g greut. corp.		
	Media	E. S.	P.	Media	E. S.	P	Media	E. S.	P
I. Martor	2,59	0,14	—	57,6	5,8	—	8 535	305	—
II. Ac. butil	2,73	0,12	>0,05	67,8	5,6	>0,05	9 240	558	>0,05
III. M.N.C.	2,55	0,12	>0,05	61,2	3,5	>0,05	9 945	657	>0,05
IV. Iononă	2,58	0,10	>00,5	67,6	6,2	>0,05	10 760	509	>0,05
V. Galat de etil	2,31	0,17	>0,05	54,9	5,2	>0,05	10 246	867	>0,05
VI. Ac. salicilic	2,34	0,09	>0,05	68,0	6,5	>0,05	9 031	442	>0,05
VII. Pl, Cu, Sn şi As	2,67	0,09	>0,05	64,3	5,0	>0,05	10 344	485	>0,05

Tabela nr. 9

Activitatea succin-dehidrogenazei hepatice (gama formazan redus în 15 minute)

Loturile	La mg ficat umed			La mg azot hepatic			La mg ac. nucleici			100 g greut. corp.		
	Media	E. S.	P	Media	E. S.	P	Media	E. S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	1,24	0,11	—	30,3	4,2	—	509,4	31,3	—	4 193	313	—
II. Ac. butil	1,31	0,10	>0,05	29,7	2,7	>0,05	461,0	58,9	>0,05	4 100	376	>0,05
III. M.N.C.	1,13	0,14	>0,05	28,2	3,1	>0,05	443,1	52,9	>0,05	4 033	369	>0,05
IV. Iononă	1,15	0,05	>0,05	29,3	2,6	>0,05	422,3	32,2	>0,05	4 499	316	>0,05
V. Galat de elil	1,06	0,04	>0,05	29,3	2,3	>0,05	451,9	38,7	>0,05	4 757	339	>0,05
VI. Ac. salicilic	1,10	0,05	>0,05	32,6	6,1	>0,05	478,1	37,0	>0,05	4 269	295	>0,05
VII. Pb, Cu, Sn şi As	1,22	0,08	>0,05	28,8	1,9	>0,05	460,3	33,8	>0,05	4 710	280	>0,05

Scăderea activității transaminazei glutamic-aspartice la loturile care au primit metil-naftil-cetonă și acid salicilic nu este semnificativă din punct de vedere statistic (tabela nr. 11).

Activitatea transaminazei glutamic-alaninice scade de asemenea sub influența substanțelor administrate. Diferențele față de lotul martor sînt semnificative din punct de vedere statistic numai în cazul acetatului de butil, cînd raportarea se face la mg de acid dezoxiribonucleic și la greutatea corporală, apoi în cazul galatului de etil cînd raportarea se face la greutatea ficatului și la conținutul de azot al acestuia, iar în cazul administrării concomitente a plumbului, cuprului, staniului și arsenului cînd raportarea se face la mg acid dezoxiribonucleic (tabela nr. 12).

DISCUȚIE

Din analiza rezultatelor obținute reiese că activitatea enzimatică a ficatului a fost afectată de toate substanțele cercetate, confirmîndu-se astfel concluziile noastre anterioare privind nocivitatea acidului salicilic, a galatului de etil, a amestecului de plumb, cupru, staniu și arsen și a unor aromatizanți alimentari. Totodată cercetarea aduce elemente noi privind modul de acțiune a substanțelor cercetate. Din acest punct de vedere trebuie subliniată existența unor trăsături comune în modul lor de acțiune, și anume faptul că la toate loturile experimentale s-a înregistrat o creștere semnificativă a activității aldolazei și lipsa modificărilor în activitatea succin-dehidrogenazei și în conținutul de acid dezoxiribonucleic al ficatului.

Creșterea activității aldolazei hepatice arată că substanțele cercetate au influențat reacția reversibilă de scindare a fructozo-1, 6-difosfatului. Fiind vorba de un efect toxic, creșterea activității aldolazei trebuie interpretată ca o deplasare a echilibrului reacției catalizate de enzimă, spre formarea acidului piruvic, deci ca o tendință de spoliere a rezervelor de glicogen ale ficatului.

Faptul că nu s-au înregistrat modificări în activitatea succin-dehidrogenazei hepatice arată că substanțele cercetate nu au influențat procesele de respirație tisulară aerobă.

Lipsa modificărilor în conținutul de acid dezoxiribonucleic al ficatului arată că substanțele cercetate nu au afectat sinteza nucleoproteinelor.

Pe lîngă caracteristicile comune menționate apar și unele diferențe în modul de acțiune al substanțelor, respectiv în gradul de afectare a proceselor de transaminare. În timp ce acetatul de butil și amestecul de plumb, cupru, staniu și arsen au determinat o scădere a activității transaminazei glutamic-aspartice și a transaminazei glutamic-alaninice, galatul de etil și amestecul de alfa- și beta-iononă nu au influențat decît o singură verigă metabolică a procesului de transaminare, iar metil-naftil-cetona și acidul salicilic nu au influențat activitatea transaminazelor cercetate. Trebuie remarcat că există unele diferențe și în modul de acțiune a iononei și galatului de etil, în primul caz înregistrîndu-se o scădere a activității transaminazei glutamic-aspartice, iar în al doilea a transaminazei glutamic-alaninice.

Tabela nr. 10

Activitatea aldolazei hepatice (în unităţi)

Loturile	La mg ficat umed			La mg azot hepatic			La mg ac. nucleici			La 100 g greut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	0,91	0,07	—	22,1	3,3	—	336,3	32,1	—	2 854	248	—
II. Ac. butil	1,14	0,07	<0,02	26,8	2,2	>0,05	424,9	40,7	>0,05	3 832	253	>0,05
III. M.N.C.	1,07	0,04	<0,05	27,6	1,4	>0,05	420,4	38,0	>0,05	4 164	177	<0,01
IV. Iononă	1,12	0,02	<0,003	29,7	2,1	>0,05	436,1	18,5	<0,01	4 663	199	<0,001
V. Galat de etil	1,07	0,04	<0,05	25,9	1,6	>0,05	477,0	32,7	<0,003	4 777	250	<0,001
VI. Ac. salicilic	1,06	0,04	>0,05	31,6	3,8	>0,05	454,4	17,3	<0,001	4 098	223	<0,01
VII. Pb, Cu, Sn şi As	1,17	0,05	<0,003	27,7	1,3	>0,05	437,7	29,0	<0,002	4 524	358	<0,01

Tabela nr. 11

Activitatea transaminazei glutamic asparitică în micromoli piruvat format

Loturile	La g ficat umed			La mg azot hepatic			La mg ac. nucleici			La 100 g greut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	112	6,8	—	2,67	0,17	—	42,1	2,0	—	388	27,5	—
II. Ac. butil	77	6,4	<0,001	2,04	0,25	<0,05	30,3	2,9	<0,001	240	16,8	>0,001
III. M.N.C.	97	10,0	>0,05	2,44	0,33	>0,05	40,2	7,5	>0,05	424	19.4	<0,01
IV. Iononă	89	5,9	<0,01	2,38	0,21	>0,05	34,3	2.7	<0,02	359	21,9	>0,05
V. Galat de etil	88	9,8	>0,05	2,24	0,31	>0,05	34,4	4.0	>0,05	408	32,1	>0,05
VI. Ac. Salicilic	92	8,3	>0,05	2,85	0,52	>0,05	45,5	2,1	>0,05	383	38,7	>0,05
VII. Pb, Cu, Sn şi As	88	6,7	<0,01	2,19	0,24	>0,05	33,7	3.4	<0,05	348	39,5	>0,05

Tabela nr. 12

Activitatea transaminazei glutamic-alaninică (în micromoli piruvat format)

Loturile	La g ficat umed			La mg azot hepatic			La mg ac. nucleici			La 100 g greut. corp.		
	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P	Media	E.S.	P
I. Martor	140	8,6	—	3,22	0,28	—	58,2	2,4	—	503	24,1	—
II. Ac. butil	122	6,4	>0,05	2,86	0,21	>0,05	45,2	3.3	<0,003	411	21,7	<0,05
III. M.N.C.	139	7,2	>0,05	3,51	0,14	>0,05	50,6	3,1	>0,05	547	32,7	>0,05
IV. Iononă	132	4,6	>0,05	3,49	0,23	>0,05	51,5	2,8	>0,05	551	26,7	>0,05
V. Galat de etil	113	10,0	<0,05	2,74	0,38	<0,05	50,4	5,3	>0,05	498	35,0	>0,05
VI. Ac. salicilic	133	1,2	>0,05	3,96	0,56	>0,05	57,1	2,4	>0,05	512	18,1	>0,05
VII. Pb, Cu, Sn si As	136	4,0	>0,05	3,36	0,18	>0,05	51,5	2,3	<0,05	528	23,8	>00,5

Mecanismul de transaminare reprezentînd una din căile cele mai importante de sinteză și dezaminare a aminoacizilor în organism, diminuarea activităților transaminazelor glutamic-aspartică și glutamic-alaninică poate fi interpretată ca o scădere a sintezei aminoacizilor la nivelul celulei hepatice, precum și ca o metabolizare scăzută a aminoacizilor în acizi grași și glucide.

O dificultate care apare în interpretarea rezultatelor constă în faptul că semnificația statistică a diferențelor dintre loturi depinde în unele cazuri de modul de exprimare a datelor. Așa de exemplu, în cazul acetatului de butil creșterea aldolazei este semnificativă cînd raportarea se face la greutatea ficatului umed, dar este nesemnificativă cînd raportarea se face la mg de acid dezoxiribonucleic. Aceasta se explică prin faptul că la lotul ce a primit acetat de butil acidul dezoxiribonucleic prezintă valori mai crescute decît la lotul martor ; deși primele nu diferă semnificativ față de lotul martor, ele influențează totuși raportul. Semnificația sau lipsa de semnificație a diferențelor depind și de mărimea erorii standard. De exemplu, în timp ce la lotul ce a primit amestecul de plumb, cupru, staniu și arsen diferențele în activitatea transaminazei glutamic-alaninice sînt semnificative la o medie de 51,5 media martorului fiind 58,2, la lotul care a primit galat de etil diferențele față de lotul martor nu sînt semnificative statistic, cu toate că media lotului este 50,4. Explicația acestei contradicții aparente constă în faptul că în timp ce în primul caz eroarea standard este 2,3, în al doilea caz ea este 5,3. Rezultă deci că modul de raportare a rezultatelor poate influența în mare măsură concluziile, putînd facilita sau îngreuna evidențierea unui fenomen. Din acest punct de vedere utilizarea mai multor moduri de exprimare a rezultatelor, deși mai dificilă, permite o apreciere mai judicioasă a rezultatelor. Multiplicarea variantelor de exprimare a rezultatelor este utilă numai în măsura în care raporturile utilizate furnizează date concludente. Unul din criteriile de alegere a modului de exprimare a rezultatelor ar putea să-l reprezinte eroarea standard, dîndu-se preferință acelora care asigură o eroare standard mică.

Făcînd media erorii standard în funcție de modul de exprimare a rezultatelor, în 20 de cazuri, rezultă că în timp ce raportarea la greutatea ficatului umed determină o eroare standard medie care reprezintă 3,9% din valoare, în raportarea la greutatea corporală eroarea standard este 4,2%, la mg de acid dezoxiribonucleic 5,3, iar la azotul hepatic 7,7%. Aceste date arată că, în condițiile noastre experimentale, cel mai avantajos mod de exprimare a rezultatelor a fost raportarea la greutatea ficatului, respectiv la greutatea corporală, iar cel mai desavantajos raportarea la conținutul de azot al ficatului. Raportarea rezultatelor la greutatea ficatului, respectiv la greutatea corporală, prezintă însă dezavantajul că înșiși acești indicatori pot fi influențați de substanțele cercetate. Din acest punct de vedere apare mai avantajoasă raportarea rezultalelor la conținutul de acid dezoxiribonucleic din ficat, care s-a dovedit a fi indicatorul cel mai stabil.

Rezultalele obținute de noi demonstrează sensibilitatea crescută a testelor enzimatice și pledează pentru utilizarea lor în toxicologia alimentară. Astfel, în cazul amestecului de alfa-și- beta-iononă, cu ajutorul

testelor enzimatice utilizate s-au pus în evidenţă efecte nocive care nu au putut fi sesizate cu ajutorul probei de creştere, în experienţe cronice de reproducere, al conţinutului în acid ascorbic al glandelor suprarenale sau al tabloului sanguin. Valoarea testelor enzimatice pentru toxicologia alimentară reiese şi din reproductibilitatea rezultatelor, din omogenitatea lor, respectiv din erorile standard mici care s-au înregistrat în experienţele noastre.

CONCLUZII

Toate substanţele cercetate au produs o creştere semnificativă a activităţii aldolazei şi nu au influenţat activitatea succin-dehidrogenazei. În ceea ce priveşte activitatea transaminazelor, s-a înregistrat o scădere a ambelor enzime la loturile care au primit acetat de butil sau amestecul de plumb, cupru, staniu şi arsen, o scădere numai a transaminazei glutamic-aspartice în cazul galatului de etil şi a transaminazei glutamic-alaninice în cazul alfa şi beta iononei.

Prezentată la redacţie
la 25 aprilie 1963

Institutul de Igienă şi protecţie a muncii,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. BRUYET P., MEIGNIEN-GAUTHIER CH., DELAUNAY A., Ann Biol. Clin., **10**, *12*, 661 (1958).
2. KUN E., ABOOD L. G., Sciece, **109**, 144 (1949).
3. TOVARNITKI V. I., VOLUISKAIA J., Jurnal Microbiologhii, Epidemilologhii i Immunobiologhii, **10**, 67 (1955).
4. WEBB J., LEWY H., *Methodes of biochemical, analysis*, Edit. D. Glick, N. Y., 1956.

STUDIUL ACȚIUNII COMPUȘILOR RADIOMIMETICI (N-IPERITE) ASUPRA MACROMOLECULELOR PROTEICE

DE

GH. FURNICĂ și A. DIMITRIU

Încă din anul 1943 s-a arătat că acțiunea biologică a unor compuși chimici cu structură S-2-clor-etilenică și N-2-clor-etilenică este apropiată de aceea a radiațiilor ionizante, fapt ce a deschis un larg cîmp cercetărilor referitoare la mecanismul lor de acțiune [1]. Aceste substanțe provoacă nucleului celulelor în starea de repaus modificări ale structurii cromozomilor, iar țesuturilor hematoformatoare le provoacă o degenerescență caracteristică, alături și de alte perturbații biochimice. Derivații N-iperitici din grupul substanțelor amintite sînt utilizați în terapie ca agenți anticancerogi, datorită faptului că inhibă creșterea tumorilor maligne [2—4].

Datorită efectelor biologice terminale ale acestor compuși, care în general sînt foarte apropiate de ale radiațiilor ionizante, ei sînt cunoscuți și sub denumirea de compuși radiomimetici. Substanțele radiomimetice au acțiune alchilantă asupra unor molecule și macromolecule din organism și ele însele devin legătura dintre componentele alchilate [5]. Acțiunea lor de reticulare se explică prin formarea ionilor de imoniu, ce trec ulterior în ionii carbocationici (carbeniați) și care în continuare reacționează rapid cu o funcțiune anionică [6], [7]. Produșii reacției dintre N-iperite și funcțiunile ($-OH$)($-NH_2$) etc. ale proteinelor, nucleoproteinelor sau altor substanțe macromoleculare cu care vin în contact sînt compuși macromoleculari ireversibili, reticulați, ce prezintă proprietăți fizico-chimice diferite de ale macromoleculelor inițiale și provoacă astfel perturbări în lanțul proceselor biofizice și biochimice din organism.

Studiul cu molecule marcate a arătat că N-iperitele dispar rapid din circuitul sanguin, probabil datorită vitezei ridicate a reacțiilor amintite [8], [9].

Compușii radiomimetici, deși dau efecte biologice terminale analoge radiațiilor, ca ruperea cromozomilor, acțiunea mutagenă și carcinogenă, în funcție de doza utilizată, inhibarea formării anticorpilor, acțiunea antimitotică, acțiunea leucopenică etc. mecanismul lor de acțiune se deosebește totuși de acela al radiațiilor ionizante. În contrast cu N-iperitele, radiațiile acționează direct prin ionizare sau transfer energetic, indirect prin radicali și molecule excitate și întîrziat prin descompunerea compușilor labili formați în cursul iradierii.

Faptul că unele cercetări au constatat lipsa N-iperitelor în ţesuturile asupra cărora acestea îşi manifestă efectul lor biologic nu exclude posibilitatea acţiunii indirecte a compuşilor de acest tip [8].

Interesant de menţionat este faptul că substanţe de tipul cisteaminei sau AET conferă protecţie la acţiunea nocivă atît a N-iperitelor cît şi a radiaţiilor [10], ceea ce a creat la un moment dat ipoteza unor mecanisme de acţiune analoge.

Studiul acţiunii N-iperitelor asupra macromoleculelor biologice (proteine etc.) este la începutul lui, iar literatura nu aduce prea multe date în acest sens. Elucidarea mecanismului de acţiune biologică a N-iperitelor necesită aprofundarea cunoştinţelor privind procesele de interacţiune dintre aceşti agenţi alchilanţi şi macromoleculele biologice. Această situaţie ne-a determinat să întreprindem o serie de cercetări asupra procesului de interacţiune dintre proteine (serum-albumină) şi unele N-iperite cum sînt : sarcolizina (beta-fenilalanină-p-*2,2'*-dicloretilenamină) şi degranolul (*1,6*-bis-beta-cloretilenamină -*1,6*-dezoxi-D-manită. 2 HCl).

În acest sens, după un anumit timp de contact s-a analizat cromatografic amestecul de aminoacizi cu substanţele amintite, în condiţii determinate de temperatură şi pH, în vederea stabilirii unei eventuale afinităţi specifice.

În a doua etapă s-a urmărit procesul de interacţiune dintre N-iperite şi serum-albumină, în condiţiile unor reacţii evidenţiate de către prima etapă, cu scopul de a preciza punctul de atac al iperitelor în lanţul macromolecular al proteinei. Paralel s-a cercetat şi evoluţia în timp a proceselor chimice respective.

În al treilea stadiu al cercetărilor s-a studiat acţiunea de protecţie chimică a proteinei prin AET, împotriva atacului cu N-iperite, urmărindu-se în condiţii similare evoluţia reacţiilor chimice.

MATERIAL ŞI METODĂ

S-au studiat cromatografic modificările suferite de către componenţii unui amestec de aminoacizi (NBC) în soluţii apoase cu pH-urile respective de 5,6; 7,2; 8,6, după ce au fost incubate cu sarcolizină sau degranol, la 37°C timp de 3 sau 24 de ore.

S-au urmărit prin aceeaşi metodă modificările pe care le suferă din punct de vedere cantitativ hidrolizatele de serum-albumină (NBC) incubate cu sarcolizină sau degranol la pH-urile respective de 7,5; 8,6 şi 9,6 timp de 1 sau 8 ore.

Ultima etapă s-a desfăşurat în condiţii identice cu etapa a II-a, cu deosebirea că la 15 minute înainte de adăugarea N-iperitei s-a adăugat AET, apoi hidrolizatul total a fost supus operaţiei de cromatografiere.

Soluţiile de aminoacizi indicate în tabela nr. 1 au fost de 0,01 M fiecare, iar compuşii de N-iperite în concentraţii tot de 0,01 M fiecare. Soluţia apoasă de serum-albumină a fost utilizată în concentraţia de 0,6%, iar soluţia apoasă de AET s-a utilizat în concetraţia de 0,01 M.

Aminoacizii din proteină au fost obţinuţi prin hidroliza totală a serum-albuminei, după ce a fost incubată, folosindu-se în acest scop un amestec 1/1 de HCl concentrat şi acid formic

concentrat, timp de 24 de ore la 110°C. Determinările cromatografice au fost efectuate prin tehnica cromatogramelor descendente unidimensionale, după Block [11], folosindu-se ca lichid de irigare amestecul butanol/acid acetic/apă, pe hîrtie de filtru Whatman nr. 1, revelarea spoturilor s-a făcut cu soluție de ninhidrină 0,2 % în butanol.

Tabela nr. 1

Cromatograma soluției unui amestec de aminoacizi în concentrație de 0,01 M și incubată la 37°C (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Rf (literatură) [11], [13]	Rf calculat	Conc. de aminoacid (M/100)	Probele cromatografiate și apoi planimetrate				
				Hidrolizate după 3 ore incubare		Hidrolizate după 24 de ore incubare		
				Incubate la pH		Incubate la pH		
				5,6	7,2	5,6	7,2	8,6
Cistină	0,17	0,10	19	11—12	10—12	19—21	19	20
Lizină	0,19	0,17	48	50	48—50	58—59	56	60
Arginină	0,19	0,19	24	36—37	30—31	69	72—74	66
Taurină	0,29	0,21	42	40—42	42—44	—	—	—
Serină	0,31	0,24	45	45—48	44—48	48	45—46	55
Glicină	0,33	0,29	40	30	26	28	24	31
Ac. glutamic	0,37	0,32	49	49—51	49—52	52	52—54	58
Treonină	0,38	0,33	11	11—12	9—11	12	8—12	6
Alanină	0,39	0,39	55	55—57	58—60	53—55	57—58	55
Valină	0,57	0,58	90	28—30	29—30	—	—	—
Fenilalanină	0,66	0,66	28	28—29	29—30	31	30	30
Leucină	0,72	0,71	31	32—33	31—33	—	—	—

Determinările cantitative ale conținutului de aminoacizi din spoturi s-au efectuat densitometric, utilizîndu-se aparatura imaginată de către unul dintre noi *).

REZULTATE

Rezultatele cercetărilor efectuate sînt rezumate în tabelele nr. 1 pînă la 9, din a căror analiză desprindem următoarele constatări :

Amestecul de aminoacizi își modifică puțin conținutul său în timp și la pH diferit, constatîndu-se însă la arginină, după 24 de ore și la pH 5,6, 7,2 și 8,6, o creștere remarcabilă a conținutului, iar la treonină, tot după 24 de ore și la pH 8,6, o scădere accentuată a conținutului respectiv (tabela nr. 1).

Prezența sarcolizinei provoacă în general o scădere puțin evidențiată a conținutului de aminoacizi, cu excepția fenilalaninei și alaninei, cînd se constată o slabă creștere a conținutului respectiv. Alanina scade în conținut în primele 3 ore, iar după 24 de ore la toate valorile de pH conținutul respectiv este crescut. Lizina și în special arginina cresc ușor în conținut în cursul primelor 3 ore, la pH 8,6, apoi conținutul lor scade. Glicina prezintă

*) A. DIMITRIU, I. POP, *Determinări cantitative în cromatografie*, com. ASIT, la 15 mai 1961.

o cantitate crescută după 24 ore, la pH 8,6. Cantitatea de cistină scade numai după 24 de ore, la pH 5,6 şi 7,2 iar scăderi intense se constată la treonină după 3 ore, la pH 7,2 şi după 24 de ore la pH 5,6 şi 7,2 (tabela nr. 2).

Prezenţa degranolului determină efecte similare, cu deosebirea că provoacă o scădere mai intensă la arginină, alanină, serină şi acid glutamic. Trebuie să remarcăm scăderea accentuată a cantităţii de alanină după 24 de ore la pH 5,6 (tabela nr. 3).

Hidroliza totală a serum-albuminei a permis separarea în toate cazurile a 16—17 spoturi de aminoacizi (tabela nr. 4), a căror intensitate variază puţin cu pH-ul soluţiilor ; spoturile cu Rf mai mare decît 0,39 au coloraţia mai puţin intensă la pH 9,6. Se remarcă, la pH 8,6, că intensitatea spoturilor de lizină + histidină, acid glutamic şi alanină este mai intensă, iar arginina şi glicina au spoturile mai puţin intense decît ale restului de aminoacizi. În timp, spoturile unor aminoacizi îşi modifică intensitatea, cum este cazul de exemplu pentru pH 7,6 şi 8,6 la cisteină, unde se observă o scădere apreciabilă, iar la pH 9,6 are loc o creştere semnificativă. Cantitatea de acid glutamic la pH 8,6 scade în timp, efect mult mai accentuat în cazul tirozinei şi metioninei la pH 9,6. Probabil că în ultimul caz desprinderea radicalului metil permite formarea unei cantităţi sporite de cisteină.

Prezenţa soluţiei de AET în soluţia de serum-albumină provoacă modificări în intensitatea spoturilor obţinute după hidroliză, observîndu-se de exemplu, scăderea cantităţii de cistină la pH 7,6 şi 9,6 şi o scădere mai accentuată după o oră de incubare. Un spot nou, cu Rf = 0,23, apropiat de cel al spotului de acid aspartic, nu a fost identificat chimic ; el este probabil rezultatul unor perturbaţii aduse în lanţul macromolecular. Se mai constată o scădere accentuată a conţinutului de arginină după o oră la pH 9,5 şi o creştere accentuată a conţinutului de taurină la pH 8,6 după 1 şi 8 ore, a conţinutului de treonină la pH 7,6 după 1 oră şi a conţinutului de metionină la pH 7,6 şi 8,6 după 1 şi 8 ore (tabela nr. 7).

Adăugarea sarcolizinei la soluţia de serumalbumină determină după hidroliză formarea unor spoturi mai intense pentru cistină la pH 7,6 şi 9,5 pentru cisteină la toate pH-urile studiate, pentru lizină + histidină la pH 7,6 şi 9,5. O creştere accentuată se constată la arginină pentru pH 9,5 după 1 şi 8 ore, iar la metionină pentru pH 9,5 după 8 ore, la fel pentru tirozină şi fenilalanină. Se remarcă prezenţa în acest caz a spotului neidentificat chimic cu Rf = 0,23, a cărui intensitate este mai accentuată decît la adăugarea în soluţie a compusului AET. Se mai constată o scădere accentuată a spotului de la taurină, după o oră pentru pH 8,6 (tabela nr. 5).

Prezenţa simultană a compusului AET şi sarcolizinei a permis să se evidenţieze următoarele constatări (tabela nr. 6) :

În general, AET-ul provoacă modificarea intensităţii spoturilor pe care le-a provocat sarcolizina singură în prezenţa serum-albuminei, acest efect concretizîndu-se prin intensificarea sau diminuarea intensităţii spoturilor. Dacă la taurină sarcolizina provoacă o scădere accentuată pentru pH 8,6, prezenţa simultană a sarcolizinei şi AET-ului determină o acţiune inversă, de intensificare a spotului. Spotul de glicină, diminuat în intensitate

Tabela nr. 2

Cromatograma soluției unui amestec de aminoacizi (0,01 M) după adăugarea de 0,01 M sarcolizină și incubare (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Rf (literatură) [11], [13]	Rf calculat	Probe cromatografiate și apoi planimetrate				
			Hidrolizate după 3 ore incubare		Hidrolizate după 24 de ore incubare		
			Incubat la pH		Incubat la pH		
			5,6	7,2	5,6	7,2	8,6
Cistină	0,17	0,10	10	11	15	11	18
Lizină	0,19	0,17	51	51	52	52	56
Arginină	0,19	0,19	32	36	66	67	61
Taurină	0,29	0,21	35	36	—	—	—
Serină	0,31	0,24	42	41	47	45	50
Glicină	0,33	0,29	21	18	20	25	39
Ac. glutamic	0,37	0,32	46	54	50	50	55
Treonină	0,38	0,33	8	3	5	4	6
Alanină	0,39	0,39	45	47	60	66	58
Valină	0,57	0,58	24	24	—	—	—
Fenilalanină	0,66	0,66	39	41	38	39	38
Leucină	0,72	0,71	32	32	—	—	—

Tabela nr. 3

Cromatograma soluției unui amestec de aminoacizi (0,01 M) după adăugarea de 0,01 M degranol și incubare (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Probele cromatografiate și apoi planimetrate			
	Hidrolizate după 3 ore incubare		Hidrolizate după 24 ore incubare	
	Incubate la pH		Incubate la pH	
	5,6	7,2	5,6	7,2
Cistină	10	8	16	18
Lizină	48	50	50	54
Arginină	35	31	68	67
Taurină	31	40	—	—
Serină	44	47	44	44
Glicină	24	24	20	29
Ac. glutamic	49	50	49	51
Treonină	9	10	11	8
Alanină	50	58	34	45
Valină	30	31	—	—
Fenilalanină	30	27	29	25
Leucină	34	26	—	—

de către sarcolizină, este amplificat în prezența AET-ului. Se remarcă în cazul spotului neidentificat chimic o intensificare în această situație.

La spoturile de alanină, prolină, tirozină și fenilalanină nu se constată o influență evidentă datorită prezenței AET-ului.

Tabela nr. 4

Cromatograma hidrolizatului total al soluției de 0,6% albumină serică incubată (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Rf (literatură) [11], [13]	Rf calculat	Probele cromatografiate și planimetrate					
			Valoarea pH-ului la incubare					
			7,6		8,6		9,5	
			Timp incubare		Timp incubare		Timp incubare	
			1 oră	8 ore	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore
Cistina	0,17	0,10	19	20	20	21	19	20
Cisteina		0,18	29	25	30	25	21	28
Lizină + histidină	0,19	0,17	49	51	63	61	48	49
Arginina	0,19	0,19	25	24	20	20	24	24
Taurina	0,29	0,21	20	15	10	13	—	—
X	0,23	0,23	—	—	—	—	—	—
Serină + ac. aspartic	0,32	0,24	68	69	65	60	65	65
Glicină	0,33	0,29	28	27	25	25	32	33
Ac. glutamic	0,37	0,32	63	65	110	100	82	83
Treonină	0,38	0,33	20	22	—	—	—	—
Alanina	0,39	0,39	59	60	80	79	39	39
Prolina	0,42	0,40	14	14	14	14	10	10
Tirozina	0,53	0,49	26	25	27	25	13	7
Metionină	0,56	0,51	25	24	25	25	16	5
Valina	0,57	0,58	23	24	25	23	44	44
Fenilalanina	0,66	0,66	23	24	20	24	6	5
Leucina	0,72	0,71	47	45	50	51	31	31

Tabela nr. 5

Cromatograma soluției de 0,6% albumină serică incubată cu 0,01 M sarcolizină și apoi hidrolizată total (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Probele cromatografiate și planimetrate					
	Valoarea pH-ului la incubare					
	7,6		8,6		9,5	
	Timp incubare		Timp incubare		Timp incubare	
	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore
Cistină	28	25	18	16	24	20
Cisteină	31	24	35	26	33	29
Lizină + histidină	57	57	58	52	58	49
Arginină	22	21	27	25	51	48
Taurină	18	19	6	12	—	—
X	16	12	27	15	20	20
Serină + ac. aspartic	70	71	72	74	71	70
Glicină	34	36	17	16	37	34
Ac. glutamic	48	66	112	105	101	89
Treonină	28	23	—	—	—	—
Alanină	60	61	70	75	45	41
Prolină	14	14	15	15	12	11
Tirozină	35	26	30	24	16	12
Metionină	24	25	38	30	20	12
Valină	24	29	25	25	5	4
Fenilalanină	26	27	25	29	9	9
Leucină	49	48	60	63	39	33

Tabela nr. 6

Cromatograma soluției de 0,6 % albumină serică incubată cu 0,01 M degranol, apoi hidrolizată total (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Probele cromatografiate și planimetrate					
	Valoarea pH-ului la incubare					
	7,6		8,6		9,5	
	timp incubare		timp incubare		timp incubare	
	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore
Cistină	31	24	25	20	22	28
Cisteină	29	31	22	20	19	20
Lizină + histidină	55	48	65	41	51	49
Arginină	32	25	25	18	24	26
Taurină	6	—	6	10	—	—
X	—	—	—	—	—	—
Serină + ac. aspartic	72	70	55	49	63	62
Glicină	30	37	19	21	33	31
Ac. glutamic	60	62	90	79	88	87
Treonină	25	19	—	—	—	—
Alanină	61	62	70	65	41	38
Prolină	10	13	15	14	10	8
Tirozină	27	29	18	18	13	11
Metionină	23	21	20	20	13	15
Valină	28	25	25	15	6	4
Fenilalanină	24	23	16	20	7	6
Leucină	45	45	60	58	31	30

Tabela nr. 7

Cromatograma soluției de 0,6% albumină serică incubată cu 0,01 M AET apoi hidrolizată total (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Probele cromatografiate și planimetrate					
	Valoarea pH-ului la incubare					
	7,6		8,6		9,5	
	timp incubare		timp incubare		timp incubare	
	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore
Cistină	15	19	20	19	18	18
Cisteină	15	20	15	14	17	20
Lizină + histidină	50	53	60	57	50	45
Arginină	24	21	20	20	45	26
Taurină	24	21	23	38	—	—
X	4	14	4	9	9	20
Serină + ac. aspartic	65	63	62	66	66	74
Glicină	37	41	26	22	32	33
Ac. glutamic	75	71	99	100	94	87
Treonină	34	24	—	—	—	—
Alanină	60	60	76	70	38	40
Prolină	14	14	18	15	8	8
Tirozină	37	26	35	42	14	8
Metionină	50	52	54	45	14	6
Valină	21	26	38	32	8	3
Fenilalanină	22	24	30	32	7	6
Leucină	39	46	52	52	35	31

Tabela nr. 8

Cromatograma soluției de 0,6% albumină serică incubată cu 0,01 M AET la care, după 15 minute, s-au adăugat 0,01M sarcolizină, apoi a fost hidrolizată total (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Probele cromatografiate si planimetrate					
	Valoarea pH-ului la incubare					
	7,6		8,6		9,5	
	timp incubare		timp incubare		timp incubare	
	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore
Cistină	24	22	16	19	20	19
Cisteină	19	21	18	18	28	25
Lizină + histidină	46	53	59	59	56	47
Arginină	25	20	23	20	49	48
Taurină	23	21	32	34	—	—
X	12	14	17	12	24	28
Serină + ac. aspartic	65	68	60	70	69	75
Glicină	36	42	27	20	35	34
Ac. glutamic	64	69	107	105	98	89
Treonină	36	24	—	—	—	—
Alanină	62	66	70	72	45	40
Prolină	16	15	15	15	12	11
Tirozină	38	26	30	31	16	12
Metionină	34	36	38	36	20	12
Valină	20	29	35	30	35	4
Fenilalanină	27	29	25	27	11	10
Leucină	40	47	60	62	39	33

Tabela nr. 9

Cromatograma soluției de 0,6% albumină serică incubată cu 0,01 AET la care, după 15 minute s-au mai adăugat 0,01 M degranol, apoi a fost hidrolizată total (mărimea spotului este dată în mm²)

Spotul de aminoacid	Probele cromatografiate și planimetrate					
	Valoarea pH-ului la incubare					
	7,6		8,6		9,5	
	timp incubare		timp incubare		timp incubare	
	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore	1 oră	8 ore
Cistină	22	27	16	17	27	18
Cisteină	20	21	15	19	18	23
Lizină + histidină	53	48	52	45	49	48
Arginină	34	25	17	18	26	49
Taurină	21	20	25	25	—	
X	—	—	—	—	—	—
Serină + ac. aspartic	65	69	65	68	64	66
Glicină	28	38	24	24	32	32
Ac. glutamic	68	69	88	83	87	88
Treonină	28	24	—	—	—	—
Alanină	62	59	77	65	37	38
Prolină	14	16	16	15	8	8
Tirozină	28	27	37	20	13	11
Metionină	41	49	60	35	18	18
Valină	25	25	27	17	8	4
Leucină	41	42	59	60	32	30

Contactul dintre soluția de serumalbumină și degranol determină scăderea conținutului, după hidroliză, pentru următorii aminoacizi :

La pH 7,6 are loc o scădere accentuată a taurinei.

La pH 8,6 are loc scăderea conținutului de cisteină, lizină + histidină, serină, glicocol, acid glutamic, alanină, valină și fenilalanină. Cantitatea de metionină scade apreciabil la toate valorile de pH.

Un efect contrar se observă în cazul următorilor aminoacizi, a căror cantitate crește : la pH 7,6 pentru cisteină, pentru lizină + histidină, pentru serină, leucină, taurină etc., iar la pH 7,6 și 9,6 se constată creșterea conținutului de glicocol și tirozină. Nu se constată modificări decelabile în conținutul de prolină.

Prezența simultană a degranolului și AET-ului determină unele modificări în intensitatea spoturilor aminoacizilor obținuți după hidroliză (tabelele nr. 8 și 9). Astfel, se constată scăderea cantității de cistină la pH 7,6 și 8,6 a cantității de serină la pH 7,6 și a cantității de cisteină la toate valorile de pH studiate.

Se constată și o creștere a cantității de aminoacizi sau revenirea la conținutul lor normal în cazul următoarelor spoturi : pentru pH 7,6 la acidul glutamic, treonină și prolină, pentru pH 8,6 la taurină, alanină, tirozină și fenilalanină, iar pentru pH 7,6 și 8,6 la glicocol și metionină. Nu se constată o influență decelabilă în cazul valinei, leucinei și lizinei + histidinei.

Se evidențiază modificări ale intensității spoturilor de aminoacizi în funcție și de timpul de incubare, dependent de prezența specifică a sarcolizinei, degranolului, AET-ului sau a amestecului dintre aceste substanțe.

DISCUȚIA REZULTATELOR

Contactul dintre aminoacizi și N-iperite permite formarea unor combinații complexe intermoleculare și în același timp permite evidențierea unor afinități specifice. Din cei 12 aminoacizi studiați, numai fenilalanina și alanina nu-și modifică intensitatea spotului în prezența sarcolizinei, fapt ce arată că, în afara acestora din urmă, ceilalți aminoacizi formează combinații complexe intermoleculare. Acest proces își modifică viteza de reacție în timp și este dependent de pH-ul soluției. Modificarea în timp se explică prin acțiunea hidrolizantă a apei și prin diferențierea vitezei de reacție în funcție de valoarea pH-ului. Se constată că sarcolizina provoacă o scădere mai accentuată la treonină, ceea ce ar evidenția o afinitate mai mare față de acest aminoacid.

Degranolul, deși acționează similar sarcolizinei, prezintă o afinitate specifică față de alanină, serină și arginină și în mod deosebit, se constată o afinitate față de alanină ; în acest caz conținutul de aminoacid este profund modificat.

Hidroliza serum-albuminei a dus la separarea a 17 spoturi de aminoacizi, care în situația incubării cu AET arată formarea unor combinații intermoleculare între proteină și această substanță. Intensitatea spoturilor obținute permite a se crede posibilă legarea AET-iul la cisteina și cistina

din lanţul polipeptidic, fără a se exclude posibilitatea de legare şi la alţi aminoacizi. Faptul că spoturile taurinei, glicocolului, acidului glutamic, tirozinei şi metioninei sînt mai intense, îndeosebi la taurină, treonină şi metionină, pare a dovedi o rearanjare intramoleculară a lanţului polipeptidic, prin labilizarea unor legături ce pot elibera aminoacizii evidenţiaţi. Acest fenomen ar fi pus pe seama legării AET-ului la lanţul polipeptidic.

Sarcolizina pare că se leagă la cistină, lizină sau histidină, probabil şi la glicocolul lanţului polipeptidic, cînd pH-ul soluţiei are valoarea de 8,6, şi la arginină cînd pH-ul este 7,6. Acest proces este pus în evidenţă de intensitatea mai slabă a spoturilor respective, deşi sarcolizina nu preferă dintr-un amestec de aminoacizi compuşii enumeraţi mai sus. AET-ul, considerat ca substanţă radioprotectoare, adăugat proteinei înaintea sarcolizinei, ameliorează o serie de modificări pe care le-a provocat sarcolizina singură.

În afara acestor procese se constată modificări neparalele, cum sînt de exemplu labilizarea unor legături chimice şi chiar reacţii intrapeptidice, care determină modificări în conţinutul aminoacizilor eliberaţi.

Degranolul se comportă principial identic, dar, spre deosebire de sarcolizină, arată preferinţă faţă de taurină, acidul glutamic şi metionină, iar prezenţa anticipată a AET-ului în soluţia de serum-albumină reduce această acţiune a compusului N-iperitic menţionat.

CONCLUZII

1) Compuşii N-iperitici (sarcolizină şi degranol) manifestă afinităţi diferite faţă de aminoacizii existenţi într-o soluţie apoasă, caracter dependent de structura lor chimică. Sarcolizina pare că are afinitatea mai mare faţă de treonină, iar degranolul faţă de alanină.

2) Compuşii radioprotectori de tipul AET se leagă cu preferinţă la cisteina şi leucina lanţului polipeptidic, determinînd chiar transformări intrapeptidice, cu eliberarea unor cantităţi sporite de metionină şi alţi aminoacizi. Perturbaţiile cele mai accentuate le provoacă conţinutului de cisteină, taurină, treonină, arginină şi metionină, eliberate după hidroliza totală a proteinei.

3) Transformările intrapeptidice pot fi considerate ca procese de rearanjare moleculară, reacţii intrapeptidice şi labilizări specifice ale unor legături chimice din lanţul macromolecular.

4) Prezenţa AET-ului în lanţul polipeptidic determină modificări în procesele de interacţiune dintre proteină şi N-iperite, procese specifice compusului N-iperitic, care se manifestă sub forma unui mecanism de protecţie a macromoleculei.

Prezentată la redacţie
la 28 mai 1963

Institutul de igienă şi protecţia muncii,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. GH. DUMITRESCU, GH. FURNICĂ, Bulet. C.T.C., *4*, 49 (1958).
2. O. COSTĂCHEL, P. TĂUTU, GH. FURNICĂ, *Al 9-lea Simpoz. de radiobiologie*, Roma, 15—29 iunie, 1960.
3. F. L. LARIONOV, Vestnik Akad. medit. nauk SSSR, *2*, 1958.
4. F. L. LARIONOV, M. A. ZUV, Voprosi onkologhii, *4*, 2 (1958).
5. P. ALEXANDER, A. K. STACEY, *International Congres of Biochemistry*, Viena, 1958, Simp. nr. 9, preprint 6.
6. GH. DUMITRESCU, GH. FURNICĂ, Bulet. C.T.C., *1*, 79 (1959).
7. K. H. SCHMIDT, Strahlentherapie, **97**, 29 (1955).
8. H. G. MANDEL, Pharmacol. Rev., **11**, *4*, 743 (1959).
9. J. D. DAWISON, R. S. ROZMAN, Proc. Amer. Ass. Cancer. Res., *2*, 195 (1957).
10. J. A. THERKELSEN, Radiologica Acta, **49**, 49 (1958).
11. R. BLOK, Arch. Biochem. Biophys., **31**, 267 (1951).
12. I. M. HAIS, K. MACEK, *Cromatografia pe hîrtie*, Edit. tehnică, București, 1960.

CRIOPRECIPITAREA ÎN SUCURILE PLASMATICE ALE UNOR SEMINȚE

DE

VICTOR GHEȚIE și LUCIA BUZILĂ

În semințele plantelor există fracțiuni proteice care au proprietatea de a precipita prin răcirea sub 20°C a extractelor apoase în care sînt dizolvate. Semnalată de Briggs și Mann la extractele apoase de soia [1], această proprietate nu se limitează la o singură specie ci, așa cum am arătat într-o lucrare anterioară [2], ea este prezentă la multe proteine din semințe.

Am denumit aceste fracțiuni proteice crioproteine vegetale [2], prin analogie cu termenul de crioglobuline, utilizat în biochimia medicală pentru a defini un grup de serum-globuline umane care precipită prin scăderea temperaturii sub 37°C [3].

Se pare că crioproteinele se găsesc răspîndite numai în semințele unor plante; ele sînt prezente atît la gimnosperme cît și la angiosperme.

Fenomenul de crioprecipitare depinde de temperatura, concentrația proteică, pH-ul și concentrația în electroliți (substanțe minerale) și neelectroliți (glucide) a extractelor.

Am observat astfel că temperatura de crioprecipitare este cu atît mai joasă cu cît concentrația proteică este mai mică. Pentru concentrații proteice care se găsesc sub o anumită limită, crioprecipitarea poate fi chiar absentă. Precipitarea la rece are loc într-un interval de pH situat aproximativ între pH-ul izoelectric al proteinei respective și pH-ul 7,5. Randamentul crioprecipitării variază invers proporțional cu concentrația electroliților din soluții. Pentru concentrații ionice mari, precipitarea proteinelor la rece este complet inhibată. Glucidele exercită de asemenea o influență inhibitoare asupra crioprecipitării.

Crioproteinele semințelor pot să joace un rol bine determinat în procesul germinativ. Noi am presupus că temperatura acționează asupra germinației semințelor prin intermediul crioproteinelor, formulînd o ipoteză după care crioproteinele ar putea interveni în procesul germinativ pe două căi [4]:

1. Datorită crioproteinelor, scăderea temperaturii mediului ambiant poate determina în semințele îmbibate o creștere atît de ridicată a vîscozității conținutului celular, încît procesele enzimatice care declanșează și însoțesc germinația să fie considerabil încetinite. La acest efect se adaugă și diminuarea activității enzimelor la temperaturi scăzute, astfel că se poate

ajunge chiar la blocarea proceselor enzimatice care determină dezvoltarea embrionului.

2. Pentru o anumită temperatură a mediului ambiant, putem presupune că semințele îmbibate nu germinează, deoarece crioproteinele precipită intracelular. Crioprecipitarea produce o alterare reversibilă a structurii protoplasmei, ceea ce se poate repercuta atît asupra proceselor enzimatice care stau la baza germinației, cît și asupra permeabilității protoplasmei. Ambele efecte concură desigur spre oprirea germinației.

Aceste două mecanisme ipotetice de intervenție a crioproteinelor în procesul germinativ pot opera și împreună, într-o succesiune determinată.

Ipoteza formulată mai sus are punctul de sprijin principal în presupunerea că fenomenele observate în extractele apoase s-ar desfășura în mod similar și în celula vie. Cum crioprecipitarea depinde nu numai de temperatura, ci și de concentrația proteică, concentrația în electroliți, neelectroliți și pH-ul soluției, este clar că fenomenele ce se observă în extracte ar putea chiar să nu aibă loc în celule, unde acești parametri se găsesc în alte raporturi. Astfel, în celulă, pH-ul, concentrația electroliților (substanțe minerale), concentrația neelectroliților (glucide) și concentrația proteică sînt mult mai ridicate decît în extractele apoase studiate de noi. Or, substanțele minerale și glucidele exercită o influență inhibitoare asupra crioprecipitării. Astfel, am constatat că adăugînd extractelor apoase săruri minerale (cloruri, fosfați) în concentrație de 0,15—0,80 M, sau glucide (zaharoză, glucoză, manoză) în concentrații de 0,40 pînă la 0,55 M, se realizează inhibarea completă a crioprecipitării[5]. Nu este exclusă de asemenea și intervenția altor substanțe organice cu acțiune de inhibare a crioprecipitării.

Pentru a elimina din calea ipotezei noastre obiecțiunile formulate mai sus, se impunea cercetarea fenomenului de crioprecipitare nu numai în extracte, ci și în sucurile plasmatice ale semințelor îmbibate. În sucurile plasmatice, spre deosebire de extracte, raporturile dintre substanțele care determină sau influențează crioprecipitarea sînt asemănătoare cu cele existente în celule [6]. Din acest motiv am considerat că sucurile plasmatice pot fi folosite drept „modele experimentale" pentru cercetarea crioprecipitării în semințele îmbibate.

MATERIAL ȘI METODE

Semințele s-au pus la îmbibat în apă bidistilată, în cutii Petri, la 27°C. După un interval de timp dat (12 ore pentru măzăriche și 48 de ore pentru celelalte semințe), se prelucrează semințele îmbibate obținîndu-se sucul plasmatic, după tehnica indicată într-o lucrare anterioară [6]. Analiza sucurilor plasmatice s-a efectuat folosind următoarele metode :

Substanța uscată s-a determinat pe calea dehidratării sucurilor plasmatice la 105°C, în etuvă.

pH-ul s-a măsurat cu ajutorul hîrtiei indicatoare (Spezial-Indikatorpapier, Merck și pH-AN, Chemapol), deoarece s-a lucrat cu cantitate mică de suc. Precizia determinărilor este satisfăcătoare [6].

Proteinele au fost dozate prin micrometoda cu albastru de bromfenol [7], folosind pentru curba etalon proteina totală extrasă din cotiledoanele de bob.

Pentru dozarea glucidelor (substanțelor reducătoare) s-a folosit o modificare a metodei Hagedorn-Jensen, care permite măsurarea cantităților mari de glucide prezente în sucul plasmatic [8].

Pentru dozarea globală a substanțelor minerale s-a recurs la determinarea conductibilității electrice a sucurilor plasmatice, diluate 1/25 cu apă bidistilată. S-a folosit o celulă conductometrică de tip Arrhenius, atașată la un conductoscop cehoslovac, tip LP. Determinările s-au făcut la 25°C. Calculul conductibilității s-a efectuat după formula $\lambda = \frac{K}{R_x} - \lambda_a$, unde K = constanta vasului = 0,0475, λ_a = conductibilitatea apei bidistilate, R_x = rezistența măsurată (în ohmi).

Măsurătorile vîscozimetrice s-au efectuat cu microvîscozimetrul capilar Ostwald. Vîscozimetrul s-a suspendat vertical într-o baie de apă a cărei temperatură s-a menținut constantă cu ajutorul ultratermostatului Höppler. Într-un interval de temperatură cuprins între 1° —35°C s-au făcut determinări atît pentru sucuri cît și pentru apa distilată. Rezultatele sînt exprimate în vîscozitate relativă, folosind formula :

$$\eta_{rel.} = \frac{t\ \text{suc}}{t\ \text{apă}} \cdot \frac{d\ \text{apă}}{d\ \text{suc}},$$

unde t = timpul de scurgere la temperaturile experimentate (în secunde), iar d = densitatea la 20°C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Evoluția crioprecipitării în sucurile plasmatice și extractele unor semințe este cuprinsă în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Crioprecipitarea în extractele apoase și sucurile plasmatice ale semințelor (6°C)

Denumirea soiului de semințe	Crioprecipitarea *)		Temperatura **) minimă de germinație (0°C)
	extractelor apoase	sucurilor plasmatice	
Bob (*Vicia faba*)	+++	—	2—3
Soia (*Soja hispida*)	+++	+	7—8
Ricin (*Ricinus communis*)	+++	++	10—11
Varză (*Brassica oleraceea*)	+++	—	2—3
Ridiche (*Raphanus sativus*)	+++	—	1—2
Dovleac (*Cucurbita maxima*)	+++	++	13
Castravete(*Cucumis sativus*)	++	+	12—15
Pepene galben (*Cucumis melo*)	+++	+	15
Hrișcă (*Fagopyrum esculentum*)	++	+	8
Porumb (*Zea mays*)	—	—	8

*) Intensitatea crioprecipitării s-a notat astfel: — absență; + slabă; ++ medie; +++ puternică.

**) Valori date după literatură.

Datele prezentate permit următoarele observații :

1. Crioprecipitarea are loc și în sucurile plasmatice ; deci, în principiu, acest fenomen se poate desfășura și în celulele semințelor.

2. În sucurile plasmatice crioprecipitarea se petrece întotdeauna cu o intensitate mai slabă decît în extractele respective. Astfel, în extracte precipitatul depus reprezintă 20—40 % din proteina totală, pe cînd în sucuri procentul proteinei precipitate n-a trecut în nici un caz de 15 %.

3. În unele sucuri plasmatice nu se observă crioprecipitarea, deși în extractele obținute din aceleași semințe intensitatea fenomenului este mare.

Această neconcordanță între sucurile plasmatice și extractele respective are o semnificație deosebită dacă o corelăm cu temperatura minimă de germinație a semințelor respective. Constatăm astfel că în extracte crioprecipitarea este prezentă indiferent de faptul că temperatura minimă de germinație a semințelor oscilează într-un interval larg (1°—15°C). În sucurile plasmatice se constată un tablou diferit. Sucurile obținute din semințe cu temperatura minimă de germinație sub 6°C (temperatura la care s-a efectuat crioprecipitarea) nu prezintă crioprecipitare, în timp ce în sucurile semințelor cu temperaturi de germinație mai mari de 6°C se constată apariția crioprecipitării.

Această comportare ridică două importante întrebări :

1. Absența crioprecipitării în unele sucuri plasmatice este legată, așa cum am presupus, de concentrația glucidelor și substanțelor minerale ?

2. Există o corelație între temperatura minimă de germinație a semințelor și temperatura la care apare crioprecipitarea în sucurile plasmatice corespunzătoare ?

Răspunsul experiențelor la aceste întrebări este cuprins în tabela nr. 2.

Se constată că o concentrație ridicată de glucide și substanțe minerale este întotdeauna asociată cu lipsa crioprecipitării sau cu o temperatură de crioprecipitare scăzută (bob, măzăriche și fasole). Invers, concentrații mai mici de glucide și substanțe minerale se găsesc în sucurile plasmatice la care se constată crioprecipitarea la temperaturi mai ridicate (mazăre, ricin, castravete și hrișcă). Se poate deci admite că mecanismul de reglare a crioprecipitării în sucuri, deci și în celule, este realizat în principal prin jocul concentrației glucidelor și substanțelor minerale.

O dovadă în plus că absența crioprecipitării în unele sucuri plasmatice este determinată de concentrația electroliților și neelectroliților o dă următoarea experiență : din sucul plasmatic de bob se elimină, printr-o dializă de scurtă durată, realizată față de apă distilată, o parte din componentele dializabile (electroliți și neelectroliți). Pe măsură ce sucul plasmatic sărăcește în aceste componente, se constată apariția treptată a fenomenului de crioprecipitare. Evident că nu se efectuează decît o eliminare parțială a elementelor dializabile, pentru a nu determina precipitarea proteinelor prin desalifiere.

Deci, în sucul plasmatic de bob crioproteina este prezentă, însă proprietatea ei de a precipita la rece este anihilată prin concentrația ridicată de săruri minerale și glucide.

Tabela nr. 2

Variația pH-ului substanței uscate, proteinelor, glucidelor, substanțelor minerale și temperaturii critice de crioprecipitare în sucul plasmatic a unor semințe

Denumirea seminței	pH	Substanță uscată (g%)	Proteine (g%)	Glucide (ml $S_2O_3Na_2$ N/133 la 0,1 ml suc)	Substanțe minerale (conductibilitatea sucului diluat 1/25 $\times 10^{-5}$ Ω^{-1} cm^{-1})	Temperatura critică de crioprecipitare *) (°C)	Temperatura minimă germinație (°C)
Bob (*Vicia faba*)	6,6	20,71	7,32	8,13	82,0	Nu crioprecipită	3—4
Măzăriche (*Vicia sativa*)	6,6	28,05	8,12	8,92	75,2	3—4	2—3
Fasole (*Phaseolus vulgaris*)	6,8	21,29	4,24	7,89	103,1	Nu crioprecipită	8—10
Mazăre (*Pisum sativum*)	6,8	20,17	5,28	6,94	65,7	8—9	1—2
Ricin (*Ricinus communis*)	6,5	13,33	5,56	5,65	37,0	10—11	10—11
Castravete (*Cucumis sativus*)	6,6	12,45	—	3,57	54,0	8—10	12
Hrișcă (*Fagopyrum esculentum*)	6,3	6,13	3,30	5,60	29,4	9—10	8

*) Temperatura critică de crioprecipitare = cea mai ridicată temperatură care mai provoacă crioprecipitarea.

Urmărind pH-ul sucurilor plasmatice, constatăm că acest factor nu poate acționa la reglarea crioprecipitării, deoarece toate valorile determinate se găsesc în zona de pH în care crioprecipitarea este posibilă (pH < 7,0). De asemenea, concentrațiile proteice ridicate ale sucurilor plasmatice (de 2—3 ori mai mari decît în extractele respective) exclud posibilitatea ca absența crioprecipitării să fie pusă pe socoteala cantităților mici de crioproteine.

În ceea ce privește corelația dintre temperatura minimă de germinație a semințelor și temperatura critică de crioprecipitare a sucurilor, se constată o bună corespondență, cu excepția sucului plasmatic de mazăre.

Urmărind datele din tabelă, constatăm că prin răcirea sucurilor de fasole, și bob, chiar la 0°C, nu se observă fenomenul de crioprecipitare. Pentru sucul plasmatic de fasole această comportare este neașteptată și neconcordantă cu temperatura minimă de germinație a semințelor, cuprinsă între 8—10°C. Temperatura minimă de germinație a semințelor de bob este suficient de scăzută (3—4°C) pentru a justifica comportarea sucului lor plasmatic.

În ambele cazuri însă, absența, crioprecipitării ridică întrebarea : cum se realizează la aceste semințe inhibarea germinării ?

Am încercat să dăm o soluție acestei probleme, sprijinindu-ne pe ipoteza noastră după care crioproteinele pot interveni în procesul germinativ nu numai prin crioprecipitare, ci și prin creșterea considerabilă a vîscozității sucului plasmatic. În acest scop am urmărit variația cu temperatura a vîscozității relative a sucului plasmatic de bob și fasole. Rezultatele sînt înfățișate în figura 1.

Vîscozitatea ambelor sucuri crește pe măsură ce temperatura mediului ambiant scade. Această variație nu se constată decît într-o foarte slabă măsură la sucul plasmatic al semințelor de mazăre din care s-a eliminat în prealabil crioproteina și nu se constată deloc la sucul plasmatic al frunzelor de tomate, care nu posedă crioproteine.

Comportarea lor apare normală, știind că creșterea considerabilă a vîscozității sucurilor este produsă de crioproteine [2].

Examinînd în figură zona de temperatură în care se produce saltul vîscozității, se observă diferențe între sucul de fasole și cel de bob. La sucul de fasole zona de temperatură în care are loc saltul vîscozității este deplasată spre temperaturi mai mari decît la sucul de bob. Este interesant de observat că punctele de intersecție ale asimptotelor duse la cele două ramuri ale curbelor sînt plasate într-o zonă de temperatură care corespunde temperaturii minime de germinație a semințelor. Astfel, pentru fasole asimptotele se întîlnesc în zona de temperatură 9—10°C (temperatura minimă de germinație a semințelor : 8—10°C), iar pentru bob punctul de intersecție al asimptotelor se găsește în zona 4—5°C (temperatura minimă de germinație a semințelor : 3—4°C).

Corespondența acestor mărimi poate fi accidentală. Nu este însă exclus ca ea să reflecte particularitățile structurale ale protoplasmei semințelor la o temperatură dată, legată de natura crioproteinei și a substanțelor crioinhibitoare prezente în semințe. Creșterea excesivă a vîscozității proto-

plasmei într-o anumită zonă de temperatură ar putea acționa și singură, neînsoțită de crioprecipitare, ca factor de reglare a germinației în raport cu temperatura mediului ambiant.

Rezultatele acestor experiențe ne-au întărit convingerea că, datorită proprietății de crioprecipitare cu care sînt înzestrate unele fracțiuni proteice,

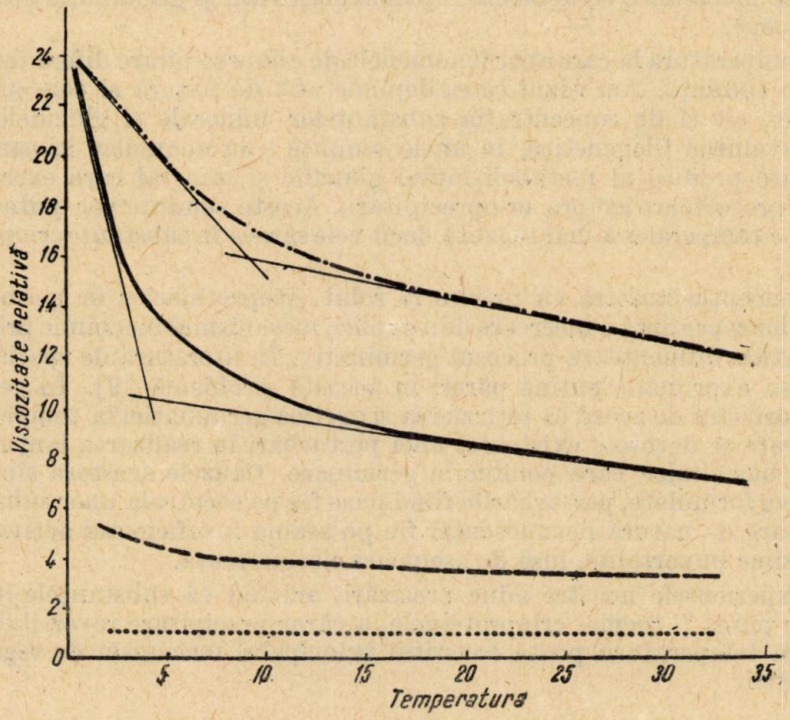


Fig. 1. — Variația vîscozității relative a unor sucuri plasmatice cu temperatura. Vîscozitatea relativă s-a calculat după formula : η rel $= \frac{t \text{ suc}}{t \text{ apă}} \cdot \frac{d \text{ apă}}{d \text{ suc}}$ unde t = timpul de scurgere la diferite temperaturi (în secunde) și d = densitatea la 20°C.

—.—.—. suc plasmatic din semințe de fasole *(Phaseolus vulgaris)*;
– – – – suc plasmatic din semințe de bob *(Vicia faba)*;
– – – – suc plasmatic din semințe de mazăre *(Pisum sativum)* din care s-a eliminat crioproteina, prin precipitare la 2°C;
. . . . suc plasmatic din frunze de tomate *(Solanum lycopersicum)*.

semințele pot avea un sistem sensibil de reglare a metabolismului, care le permite să reacționeze eficient la scăderea temperaturii mediului ambiant. Astfel, la o anumită temperatură, în citoplasma semințelor îmbibate se declanșează fenomenul de crioprecipitare sau de creștere vertiginoasă a vîscozității. Din această cauză, viteza de germinație a semințelor se micșorează. Dacă scăderea temperaturii continuă, crioprecipitarea se produce cu o intensitate din ce în ce mai mare, ceea ce determină o scă-

dere din ce în ce mai accentuată a vitezei de germinație. Sub temperatura minimă de germinație a semințelor, fenomenul de crioprecipitare este atît de intens încît blochează procesele biochimice interesate în germinație. Crescînd temperatura mediului ambiant, crioproteinele reintră treptat în matricea plasmatică (fenomenul de crioprecipitare este reversibil!), procesele biochimice se deblochează în același ritm și germinația semințelor reîncepe.

Temperatura la care apar fenomenele de crioprecipitare diferă de la sămînță la sămînță. Am văzut că ea depinde atît de natura și concentrația proteinei, cît și de concentrația substanțelor minerale și glucidelor. În cursul evoluției filogenetice, în unele semințe s-au acumulat în cantități însemnate produși ai metabolismului glucidic și mineral care exercită o acțiune protectoare asupra crioprecipitării. Aceste semințe vor putea germina la o temperatură mai scăzută decît cele sărace în substanțe crioprotectoare.

Concepția noastră cu privire la rolul crioproteinelor în germinația semințelor reprezintă o încercare de a explica mecanismul biochimic prin care temperatura influențează procesul germinativ. În literatura de specialitate se găsesc exprimate puține păreri în această problemă [9]. În general, toți autorii sînt de acord că întîrzierea și oprirea germinației la temperaturi neadecvate se datoresc existenței unei perturbări în realizarea lanțului de procese biochimice care conduc la germinare. Cauzele acestora sînt însă foarte vag formulate, perturbările fiind puse fie pe socoteala unor substanțe inhibitoare de natură necunoscută, fie pe seama insuficientei activități a unei enzime importante, însă de asemenea necunoscută.

Experiențele noastre aduc precizări, arătînd că substanțele inhibitoare ar putea fi tocmai crioproteinele, a căror precipitare reversibilă sub influența temperaturii poate constitui principalul mecanism de reglare a germinației.

CONCLUZII

Fenomenul de crioprecipitare poate avea loc și în sucurile plasmatice ale semințelor. În aceste sucuri, substanțele minerale și glucidele îndeplinesc un rol principal în reglarea crioprecipitării. În anumite cazuri s-au putut stabili corespondențe satisfăcătoare între temperatura minimă de germinație a semințelor și temperatura de crioprecipitare a sucurilor plasmatice corespunzătoare.

Aceste date experimentale concură spre concluzia generală că prezența crioproteinelor în semințele plantelor are o semnificație fiziologică și biochimică, fenomenul de crioprecipitare constatat in vitro la sucurile plasmatice putînd avea loc și în celule, în raport cu temperatura mediului ambiant. Desigur că se pot aduce obiecții împotriva folosirii sucurilor plasmatice ca „modele experimentale" pentru cercetarea crioprecipitării în celulele semințelor. Pînă în prezent însă, aceste sucuri rămîn singurele materiale de studiu, deoarece încercările noastre de a aplica o tehnică di-

rectă, microscopică, de urmărire intracelulară a crioprecipitării nu ne-au dat satisfacție. Găsirea și aplicarea unei tehnici microscopice adecvate ar putea aduce confirmarea sau infirmarea concepției noastre asupra rolului crioproteinelor în germinație.

Prezentată la redacție
la 23 septembrie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. D. BRIGGS, L. MANN, *An electrophoretic analysis of soybean proteins*, Cereal chem., 27, 243 (1950).
2. V. GHETIE, L. BUZILĂ, *Crioproteinele vegetale*, St. cercet. biochimie, **V**, *1*, 65 (1962).
3. G. BISERTE, *Les cryoglobulinémies* Ann. biol. clin., **19**, *3—4*, 265 (1961).
4. V. GHETIE, *Pflanzenkryoproteine und ihre Rolle in der Samenkeimung*, în *Internationales Symposium Physiologie, Ökologie, Biochemie der Keimung*, Greifswald, 1963, A VII C 4.
5. V. GHETIE, L. BUZILĂ, Date nepublicate.
6. V. GHETIE, L. BUZILĂ, *Obținerea sucului plasmatic din semințe*, St. cercet. biochimie, **VI**, *2*, 235 (1963).
7. L. M. DZIALOSZYNSKI, *Colorimetric microdetermination of protein*, în *IV-th International Congress of Biochemistry*, Wien, *Sect. 17—13*, 199 (1958).
8. CH. S. HANES, *An application of the method of Hagedorn-Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars*, Biochem. J., **23**, 99 (1929).
9. А. В. ПОПЦОВ, *Значение температурного фактора в прорастании семян*, Ж. Общ. биол., **22**, 425 (1961).

EFECTUL FLUORURII ȘI AL CONCENTRAȚIEI ADENOZINTRIFOSFATULUI ASUPRA VITEZEI ȘI EFICIENȚEI FOSFORILĂRII OXIDATIVE ÎN MITOCONDRII

DE

C. GURBAN și ELENA CRISTEA

În experiențe în care s-a urmărit variația eficienței fosforilării oxidative în prezența succinatului [1] s-a constatat o scădere continuă a valorilor raportului P/O în timp. Pe de altă parte, valorile cîtului P/O obținute cu succinat după incubări scurte întrec cu mult valorile maxime ale cîtului P/O pentru acest substrat. În unele experiențe s-au obținut, după incubări de 7 min, cîturi P/O cu valori de 3,25; după 20—25 min de incubare cîturile P/O au avut adesea valori mai mari decît 2 [1], [2], [3]. Așa cum s-a arătat [1], valorile mari ale cîtului P/O sînt determinate de o dispariție rapidă a fosfatului din mediu în primele minute după adăugarea glucozei și a hexokinazei. Viteza captării fosfatului din mediu scade apoi brusc la o valoare mai mică și constantă.

În lucrarea de față s-a cercetat dacă și în prezența glutamatului are loc o încorporare mai rapidă a fosfatului în ATP * în primele minute și dacă această încorporare este mai eficientă decît cea din minutele următoare.

De asemenea s-a cercetat atît cu succinat cît și cu glutamat, efectul variației concentrației ATP-ului în mediu și efectul adăugării fluorurii asupra vitezei de captare a fosfatului, asupra vitezei consumului de oxigen și asupra valorilor cîtului P/O.

După cum au arătat Slater și Bonner [4], fluorura în prezența fosfatului este un inhibitor competitiv slab al succinat-dehidrogenazei. Efectul ionilor F^- asupra cîtului P/O cu succinat este variabil. Greengard și colab. [5], cu sarcozomi din inimă, nu obțin modificări ale valorii cîtului P/O în prezența fluorurii pînă la o concentrație de 40 mM. Cu mitocondrii din ficat, în prezența fluorurii, într-o experiență obțin cîturi P/O cu valori mai mari, însă într-o altă experiență, valorile cîtului P/O nu se modifică la adăugarea fluorurii. Whittam și colab. [6] obțin, din contră, scăderi ale cîtului P/O în prezența fluorurii.

Oxidarea glutamatului în mitocondrii are loc în cea mai mare parte prin transaminarea sa în aspartat, pe calea transaminazei glutamic-oxala-

---

* Prescurtările utilizate sînt următoarele: ADP = adenozin-difosfat; ATP = adenozin-trifosfat; EDTA = etilen-diamin-tetraacetat; NAD = nicotinamid-adenin-dinucleotid oxidat; $NADH_2$ = nicotinamid-adenin-dinucleotid redus.

cetice, urmată de oxidarea α-cetoglutaratului la oxalacetat [7], [8]. Ionii F^- inhibă și oxidarea glutamatului [7], ceea ce confirmă schema propusă pentru oxidarea glutamatului în mitocondrii [7], [8].

Rezultatele prezentate în această lucrare confirmă influența inhibitoare a fluorurii asupra respirației cu succinat și glutamat, și demonstrează că gradul de inhibiție al consumului de oxigen depinde de concentrația ATP-ului în mediu. Creșterea concentrației ATP-ului, atît în prezența cît și în absența fluorurii, determină o captare mai rapidă a fosfatului din mediu, ducînd la creșterea valorilor cîtului P/O.

METODĂ

S-a lucrat cu mitocondrii izolate din ficat de șobolan sau din rinichi de cobai. Separarea mitocondriilor s-a făcut prin centrifugări fracționate, la 0°C, după tehnica descrisă în [2], cu deosebirea că pentru omogeneizarea țesutului s-a folosit manitol 0,3 M [9]. Sedimentul mitocondrial a fost suspendat în manitol 0,3 M sau în manitol 0,23 M + zaharoză 0,07 M [9].

Proteinele au fost dozate prin metoda biuretului, modificată de Aldridge [10]; fosfatul anorganic a fost dozat prin metoda Fiske-Subbarow [11]. Consumul de oxigen a fost determinat cu tehnica manometrică Warburg. Mediul de reacție (2 ml) a avut următoarea compoziție: tampon fosfat de potasiu, pH 7, 4, 15 mM; citocrom c 0,02 mM; $MgSO_4$ 6,7 mM; substrat 10 mM; EDTA 1 mM; zaharoză 0,1 M; glucoză 30 mM; hexokinază 200—300 unități KM; ATP 0,5 sau 3,5 mM; și, acolo unde este indicat, KF 14 mM. Mitocondriile, 10—12 mg proteină, au fost pipetate în compartimentul principal al cupei și, după termoechilibrare la 25°C, s-a răsturnat glucoza și hexokinaza din diverticul și s-a început măsurarea consumului de oxigen și captarea fosfatului din mediu.

REZULTATE

În tabelele nr. 1 și 2 sînt prezentate rezultatele obținute în prezență de glutamat ca substrat. S-a determinat consumul de oxigen (ΔO) și fosfatul anorganic captat din mediu (ΔP), apoi s-a calculat raportul P/O. În tabela nr. 1 sînt date rezultatele obținute în absența fluorurii, iar în tabela nr. 2 în prezență de fluorură 14 mM. În ambele cazuri s-au utilizat două concentrații de ATP: 0,5 și 3,5 mM. Se constată că valorile cîtului P/O sînt mai mari după incubări de 5 min decît după incubări de 15 min. După 5 min, în prezență de ATP 0,5 mM, valoarea medie a cîtului P/O este 2,54 fără fluorură și 4,01 cu fluorură; în prezență de ATP 3,5 mM, valoarea medie a cîtului P/O este 4,22 fără fluorură și 5,46 cu fluorură. După incubări de 15 min, valoarea medie a cîtului P/O este, la concentrația ATP-ului de 0,5 mM, de 2,31 fără fluorură și 2,59 cu fluorură; la concentrația ATP-ului de 3,5 mM, valorile cîtului P/O sînt 2,77 fără fluorură și 3,31 cu fluorură.

În tabelele nr. 3 și 4 sînt prezentate rezultatele obținute cu succinat ca substrat, în diferite condiții.

Tabela nr. 1

Viteza consumului de oxigen de fosfat şi citul P/O cu glutamat în absenţa fluorurii

[Mediul de incubaţie cuprinde : fosfat de potasiu pH 7,4, 15 mM ; citocrom c 0,02 mM ; $MgSO_4$ 6, 7 mM ; glutamat 10 mM ; EDTA 1 mM ; zaharoză 0,1 M ; glucoză 30 mM : hexokinază 200 — 300 unităţi KM ; ATP 0,5 mM sau 3,5 mM ; 10 — 12 mg proteină mitocondrială. Volum final 2 ml. Temperatura 25°C]

Nr. exp.	Timp de incubare min	[ATP] = 0,5 mM			[ATP] = 3,5 mM		
		ΔP µ moli	ΔO µ atomi	P/O	ΔP µ moli	ΔO µ atomi	P/O
1	5	4,66	1,40	3,32	9,70	1,97	4,92
2	5	5,55	2,28	2,43	7,55	1,91	3,95
3	5	4,69	2,17	2,16	7,48	1,98	3,77
Medii		4,97	1,95	2,54	8,24	1,95	4,22
1	15	14,74	5,97	2,46	20,36	6,67	3,08
2	15	14,66	6,42	2,29	14,88	5,58	2,66
3	15	14,15	6,42	2,20	16,74	6,53	2,56
Medii		14,52	6,27	2,31	17,33	6,26	2,77

Tabela nr. 2

Viteza consumului de oxigen de fosfat şi citul P/O cu glutamat în prezenţă de KF 14 mM

[Condiţii de incubare ca în tabela nr. 1 cu singura deosebire că mediul mai cuprinde şi KF 14 mM]

Nr. exp.	Timp de incubare min	[ATP] = 0,5 mM			[ATP] = 3,5 mM		
		ΔP µmoli	ΔO µ atomi	P/O	ΔP µ moli	ΔO µ atomi	P/O
1	5	5,03	1,05	4,79	5,79	0,85	6,81
2	5	4,35	1,19	3,65	5,33	1,15	4,63
3	5	4,59	1,31	3,50	5,25	0,85	6,17
4	5	6,93	1,65	4,07	8,28	1,68	4,92
Medii		5,22	1,30	4,01	6,16	1,13	5,46
1	15	12,00	4,66	2,57	13,18	4,49	2,93
2	15	11,26	5,05	2,23	—	—	—
3	15	11,11	4,66	2,38	11,63	3,32	3,50
4	15	12,00	3,47	3,17	14,35	3,98	3,60
Medii		11,59	4,46	2,59	13,03	3,93	3,31

Rezultatele obţinute cu glutamat sînt similare celor obţinute cu succinat, prezentate în [1] sau în tabelele nr. 3 şi 4. Pe de o parte, cîturile P/O au valori mai mari după incubări de 5 min decît după 15 min, pe de altă parte, în unele condiţii se obţin şi cu glutamat cîturi P/O cu valori mai mari decît cele calculate din schema de reacţie a glutamatului. Valoarea cea mai mare a cîtului P/O la glutamat a fost 5,5 (în prezenţă de fluorură 14 mM şi de ATP 3,5 mM).

Pentru a pune în evidenţă efectul variaţiei concentraţiei ATP-ului şi efectul adăugării fluorurii, în tabelele nr. 5 şi 6 sînt date rapoartele între

Tabela nr. 3

Viteza consumului de oxigen de fosfat și citul P/O cu succinat, în absența fluorurii

[Condiții de incubare ca în tabela nr.1 ; în loc de glutamat, mediul cuprinde succinat 10mM]

Nr. exp.	Timp de incubare min	[ATP] = 0,5 mM			[ATP] = 3,5 mM		
		ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O	ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O
1	5	5,33	2,90	1,83	7,03	3,31	2,12
2	5	6,22	2,49	2,49	9,03	3,40	2,65
3	5	8,36	4,46	1,87	11,77	4,86	2,42
4	5	7,11	2,63	2,70	8,29	2,89	2,86
5	5	7,85	3,73	2,10	10,52	4,13	2,57
6	5	6,36	3,59	1,79	9,33	3,72	2,50
Medii		6,87	3,30	2,08	9,33	3,72	2,51
2	15	14,81	9,57	1,54	16,81	8,98	1,87
4	15	17,25	9,45	1,82	19,49	10,21	1,98
5	15	18,59	11,09	1,67	20,37	10,59	1,92
6	15	16,22	10,08	1,60	18,66	9,27	2,01
Medii		16,71	10,05	1,66	18,83	9,76	1,93

Tabela nr. 4

Viteza consumului de oxigen de fosfat și citul P/O cu succinat în prezență de KF 14 mM

[Condiții de incubare ca în tabela nr. 1 ; mediul cuprinde în plus KF 14 mM și în loc de glutamat succinat 10 mM]

Nr. exp.	Timp de incubare min	[ATP] = 0,5 mM			[ATP] = 3,5 mM		
		ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O	ΔP μ moli	ΔO μ atomi	P/O
1	5	7,11	2,06	3,45	4,81	1,40	3,43
2	5	6,74	3,08	2,18	6,59	2,17	3,03
3	5	8,00	3,98	2,01	4,51	1,66	2,71
4	5	7,40	2,57	2,87	8,07	2,42	3,33
5	5	8,00	3,47	2,30	8,36	3,16	2,64
6	5	6,96	2,96	2,35	7,25	2,04	3,55
Medii		7,37	3,02	2,44	6,60	2,14	3,08
1	15	9,63	5,86	1,64	8,00	3,62	2,21
2	15	14,00	9,07	1,54	11,18	5,94	1,88
3	15	12,59	7,69	1,59	11,18	5,30	2,11
4	15	17,85	9,10	1,96	19,18	9,14	2,09
5	15	15,77	9,10	1,73	14,66	7,13	2,06
6	15	11,18	6,98	1,60	11,70	6,05	1,92
Medii		13,50	7,96	1,68	12,65	6,19	2.04

Tabela nr. 5

Efectul creşterii concentraţiei ATP-ului asupra vitezei consumului de oxigen, de fosfat şi asupra valorii citului P/O
[Sînt comparate valorile prezentate în tabelele nr. 1 – 4]

	Timp de incubare min	Succinat		Glutamat	
		– KF	+ KF	– KF	+ KF
$\frac{\Delta P\ [ATP] = 3,5\ mM}{\Delta P\ [ATP] = 0,5\ mM}$	5	1,35	0,89	1,66	1,18
$\frac{\Delta O [ATP] = 3,5\ mM}{\Delta O\ [ATP] = 0,5\ mM}$	5	1,12	0,70	1,00	0,87
$\frac{P/O\ ATP = 3,5\ mM}{P/O\ ATP = 0,5\ mM}$	5	1,20	1,26	1,66	1,36
$\frac{\Delta P\ [ATP] = 3,5\ mM}{\Delta P\ [ATP] = 0,5\ mM}$	15	1,12	0,93	1,19	1,12
$\frac{\Delta O\ [ATP] = 3,5\ mM}{\Delta O\ [ATP] = 0,5\ mM}$	15	0,97	0,77	1,00	0,88
$\frac{P/O\ \ ATP = 3,5\ mM}{P/O\ \ ATP = 0,5\ mM}$	15	1,15	1,21	1,19	1,23

Tabela nr. 6

Efectul adăugării fluorurii asupra vitezei consumului de oxigen, de fosfat şi asupra valorii citului P/O
[Sînt comparate valorile prezentate în tabelele nr. 1 – 4]

	Timp de incubare min	Succinat		Glutamat	
		[ATP] 0,5 mM	[ATP] 3,5 mM	[ATP] 0,5 mM	[ATP] 3,5 mM
$\frac{\Delta P + F^-}{\Delta P - F^-}$	5	1,07	0,70	1,05	0,74
$\frac{\Delta O + F^-}{\Delta O - F^-}$	5	0,91	0,57	0,66	0,57
$\frac{P/O + F^-}{P/O - F^-}$	5	1,17	1,22	1,57	1,29
$\frac{\Delta P + F^-}{\Delta P - F^-}$	15	0,81	0,67	0,79	0,75
$\frac{\Delta O + F^-}{\Delta O - F^-}$	15	0,79	0,63	0,71	0,62
$\frac{P/O + F^-}{P/O - F^-}$	15	1,01	1,05	1,12	1,19

valorile ΔP, ΔO și P/O, obținute în diferite condiții. În tabela nr. 5 se scoate în evidență influența creșterii concentrației ATP-ului de la 0,5 la 3,5 mM. Se observă o creștere a valorii cîtului P/O în toate cazurile. Cu succinat, cîtul P/O este cu cca. 20% mai mare, atît în prezența cît și în absența fluorurii. Cu glutamat, creșterea valorii cîtului P/O este mai marcată după incubări de 5 min. Efectul creșterii concentrației ATP-ului asupra consumului de oxigen sau de fosfat a fost variabil. În prezență de fluorură, consumul de oxigen este micșorat cu cca. 25%; în absența fluorurii, consumul de oxigen nu este modificat. Captarea de fosfat anorganic din mediu, cu excepția unui caz (succinat ca substrat în prezență de fluorură), are loc cu o viteză mai mare cînd concentrația ATP-ului este de 3,5 mM. De fapt, în aceste cazuri creșterea valorii cîtului P/O la concentrațiile mai mari de ATP are loc pe seama creșterii vitezei de captare a fosfatului anorganic din mediu. În prezență de succinat și de fluorură, cantitatea de fosfat dispărut în prezență de ATP 3,5 mM este mai mică decît cea dispărută în prezență de ATP 0,5 mM; totuși cîtul P/O are o valoare mai mare și în acest caz, deoarece consumul de oxigen este inhibat într-o măsură mai mare decît cel de fosfat.

În tabela nr. 6 se compară efectul adăugării fluorurii în mediul de incubație asupra consumului de fosfat și de oxigen și asupra cîtului P/O. Cîturile P/O după 5 min de incubare sînt mai mari în prezență de fluorură, atît cu succinat cît și cu glutamat ca substrat. Cu succinat, după 15 min de incubare cîturile P/O au aceleași valori în prezența sau în absența fluorurii; cu glutamat, după 15 min cîturile P/O continuă să fie cu cca. 15% mai mari în prezența fluorurii. Consumul de oxigen este în toate cazurile mai mic în prezența fluorurii. Inhibițiile respirației au variat de la circa 10% cu succinat și ATP 0,5 mM, pînă la circa 40% cu succinat sau glutamat în prezență de ATP 3,5 mM. În general inhibiția respirației a fost mai pronunțată la concentrațiile mari de ATP. Consumul de fosfat din mediu nu a fost modificat în prezență de ATP 0,5 mM după 5 min de incubare, nici cu succinat, nici cu glutamat. În celelalte cazuri el a fost micșorat cu circa 25%.

Într-o lucrare anterioară [1] s-a arătat că dispariția fosfatului anorganic din mediu nu este liniară; viteza este mai mare în primele minute

Tabela nr. 7

Viteza medie a consumului de fosfat și de oxigen pe 5 minute pentru intervalele 0–5 minute și 5 — 15 minute
[Cifrele pentru intervalul 0 – 5 minute sînt acelea din tabelele nr. 1 – 4; pentru intervalul: 5 – 15 minute s-a calculat diferența între valorile de la 15 minute și 5 minute]

Substrat	KF 14 mM	[ATP] = 3,5 mM		[ATP] = 0,5 mM		[ATP] = 3,5 mM		[ATP] = 0,5 mM	
		Δ P/5 minute				ΔO/5 minute			
		0–5	5–15	0–5	5–15	0–5	5–15	0–5	5–15
Succinat	–	9,33	4,75	6,87	4,92	3,72	3,02	3,30	3,37
„	+	6,60	3,02	7,37	2,56	2,14	2,02	3,02	2,57
Glutamat	–	8,24	5,54	4,97	4,77	1,95	2,15	1,95	2,16
„	+	6,16	3,44	5,22	3,18	1,13	1,40	1,30	1,58

decît în perioada următoare. Şi în experienţele prezentate în tabelele nr.1—6 viteza captării fosfatului este mai mare în intervalul 0—5 min decît în intervalul 5—15 min. În tabela nr. 7 sînt date valorile medii ale vitezei captării de fosfat şi ale consumului de oxigen în intervalul 0—5 min, precum şi vitezele medii pe 5 min pentru intervalul 5—15 min. După cum rezultă din această tabelă, viteza medie a captării fosfatului pe 5 min în intervalul 5—15 min este mult mai mică decît în intervalul 0—5 min; viteza medie a consumului de oxigen pe 5 min, este aproximativ aceeaşi în intervalele 0—5 min şi 5—15 min.

DISCUŢIA REZULTATELOR

Deoarece în mitocondriile strîns cuplate respiraţia şi fosforilarea nu sînt independente, modificarea vitezei unuia din cele două procese determină o variaţie a vitezei celuilalt proces. Cei doi factori studiaţi de noi, prezenţa fluorurii şi concentraţia ATP-ului, duc ambii, în cele mai multe cazuri, la creşterea valorii cîtului P/O. Indiferent asupra căruia din cele două procese acţionează direct aceşti factori, creşterea valorii cîtului P/O demonstrează că celălalt proces nu se modifică în mod echivalent. Fluorura inhibă consumul de oxigen într-o măsură mai mare decît captarea de fosfat; ATP-ul, în afara unui singur caz (succinat în prezenţă de fluorură), măreşte viteza captării fosfatului din mediu.

Creşterea valorii cîtului P/O cu succinat în prezenţa fluorurii a fost explicată de Greengard şi colab. [5] prin inhibiţia parţială a oxidării succinatului şi favorizarea oxidării malatului. Totuşi, dacă efectul fluorurii ar fi numai acesta, cu glutamat ar trebui să observăm o micşorare a vitezei respiraţiei, dar nu şi o modificare a valorii cîtului P/O. În prezenţa fluorurii, viteza globală a oxidării glutamatului ar fi limitată de etapa succinat → malat.

În ceea ce priveşte explicarea efectului fluorurii, mai există posibilitatea acţiunii ei asupra ATP-azelor. Totuşi, Myers şi Slater [12] demonstrează că fluorura, în concentraţiile utilizate în studiile de fosforilare oxidativă, nu are un efect semnificativ asupra ATP-azei latente a mitocondriilor, în prezenţă de Mg^{+2} şi de EDTA.

Obţinerea cu glutamat de cîturi P/O cu valori ajungînd pînă la 5,5 modifică şi problema valorii cîtului P/O cu succinat. Datele prezentate în această lucrare confirmă concluzia stabilită în [1] că, în prezenţă de succinat ca substrat adăugat, chiar dacă parţial malatul este oxidat la oxalacetat, acest fapt singur nu poate explica valorile mai mari decît 2 ale cîtului P/O.

Rezultatele obţinute de noi capătă o semnificaţie nouă în lumina unor fapte semnalate recent în literatură. În laboratoare diferite [13—16], [18], lucrîndu-se cu preparate fosforilante submitocondriale, s-a reuşit scindarea procesului de sinteză a ATP-ului în două etape distincte: *a*) o etapă în care energia mobilizată în procesul de oxidare este înmagazinată într-un intermediar macroergic relativ stabil, care poate fi izolat

din mediul de incubație, și *b*) o etapă în care legătura macroergică a acestui intermediar este transferată ADP-ului.

Griffiths [13—15], după incubări de scurtă durată, la 0°, a succinatului (nu a altui substrat) cu particule submitocondriale fosforilante, izolează un derivat fosforilat al NAD-ului (NAD~P). Particulele submitocondriale, în absența transportului de electroni, catalizează transferul fosfatului macroergic din NAD~P pe ADP, cu formare de ATP și $NADH_2$ (în prezență de glucoză și hexokinază în exces, pentru a elimina acțiunea ATP-azelor).

Webster [16], utilizînd un preparat purificat care catalizează oxidarea citocromului *c* redus, plus factorul de cuplare specific pentru acest segment al lanțului respirator [17], obține un intermediar macroergic nefosforilat, care în prezență de ADP și fosfat anorganic (plus sistemul glucoză-hexokinază) formează ATP.

Pinchot [18] obține un intermediar analog celui izolat de Webster [16], după oxidarea $NADH_2$-ului de către un preparat acelular de *Alcaligenes faecalis*. Acest intermediar cuprinde NAD legat printr-o legătură macroergică de o proteină. Intermediarul, în prezență de ATP și fosfat anorganic, dă naștere la cantități stoichiometrice de ADP, NAD și proteină.

În condițiile experimentale utilizate de noi, mitocondriile rămîn în mediul de incubație în absența glucozei și a hexokinazei circa 10 minute. Este foarte probabil ca în acest interval să se acumuleze intermediari macroergici, fosforilați sau nu, iar după adăugarea glucozei și a hexokinazei legătura macroergică să fie transferată rapid la ADP. Acest fapt ar da seama de sinteza mai rapidă a ATP-ului în primele minute. După epuizarea rezervei de intermediari macroergici, fosforilarea continuă cu o viteză staționară, etapa limitantă de viteză fiind reacția de sinteză a intermediarului (sau intermediarilor) macroergic.

Brierley și colab. [19] au pus în evidență o acumulare masivă a fosfatului anorganic și a ionilor Mg^{++} în mitocondrii intacte din inimă de bou. Această acumulare, pe care autorii o numesc translocare, nu are loc decît în prezența transportului de electroni prin lanțul respirator, dar în absența condițiilor necesare pentru fosforilarea oxidativă (prezența unui acceptor de fosfat sau a unui sistem care regenerează ADP). Fosforilarea și translocarea fosfatului, cuplate cu transportul de electroni, reprezintă două modalități de utilizare a energiei furnizate de reacțiile de oxidare. Folosirea energiei pentru acumularea fosfatului în mitocondrii exclude folosirea ei pentru fosforilare, și invers.

În experiențele noastre, fosfatul dispărut din mediu este înglobat în glucozo-6-fosfat în urma acțiunii hexokinazei, ceea ce presupune în mod obligator existența sa, cel puțin scurt timp, ca ATP. În aceste condiții, valorile mari ale vitezei captării fosfatului din mediu nu pot fi explicate printr-o acumulare a fosfatului în mitocondrii, analogă celei observate de Brierley și colab. [19].

CONCLUZII

Datele prezentate în această lucrare confirmă că şi în prezenţa glutamatului mitocondriile captează mai rapid fosfatul din mediu în primele minute de incubare, ceea ce duce, pe de o parte, la scăderea valorilor cîtului P/O cu timpul şi, pe de altă parte, la obţinerea de valori mari pentru cîtul P/O în primele minute. Valoarea maximă obţinută pentru cîtul P/O cu glutamat a fost 5,5. Rezultate similare au fost obţinute cu succinat [1] şi în prezenta lucrare.

Din studiul influenţei fluorurii şi a concentraţiei ATP-ului s-a constatat că valorile cîtului P/O sînt mai mari în prezenţă de fluorură, atît cu succinat cît şi cu glutamat ca substrate adăugate, şi că creşterea concentraţiei ATP-ului determină o mărire a valorii cîtului P/O în toate cazurile. Fluorura modifică valoarea cîtului P/O prin micşorarea consumului de oxigen, iar creşterea concentraţiei ATP-ului modifică valoarea raportului prin creşterea vitezei captării fosfatului din mediu.

Prezentată la redacţie
la 12 iunie 1963

Laboratorul de biochimie I
al Facultăţii de medicină,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. C. GURBAN, E. CRISTEA, St. cercet. biochimie, **5**, *3*, 423 (1962).
2. C. GURBAN, E. CRISTEA, St. cercet. biochimie, **4**, *4*, 551 (1961).
3. C. GURBAN, E. CRISTEA, St. cercet. biochimie, **5**, *3*, 415 (1962).
4. E. C. SLATER, W. D. BONNER, Biochem., J., **52**, 185 (1952).
5. P. GREENGARD, K. MINNAERT, E. C. SLATER, J. BETEL, Biochem. J., **73**, 637 (1959).
6. R. WHITTAM, W. BARTLEY, G. WEBER, Biochem. J., **59**, 590 (1955).
7. P. BORST, E. C. SLATER, Biochim. Biophys. Acta, **41**, 170 (1960).
8. P. BORST, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 256 (1962).
9. B. CHANCE, B. HAGIHARA, *Al V-lea Congres de biochimie*, Moscova, 1961.
10. W. N. ALDRIDGE, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
11. C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
12. D. K. MYERS, E. C. SLATER, Biochem. J., **67**, 558 (1957).
13. D. E. GRIFFITHS, R. A. CHAPLAIN, Biochem. Biophys. Res. Com., **8**, 497 (1962).
14. D. E. GRIFFITHS, R. A. CHAPLAIN, Biochem. Biophys. Res. Com., **8**, 501 (1962).
15. D. E. GRIFFITHS, R. A. CHAPLAIN, Biochem. J., **85**, 20P (1962).
16. G. WEBSTER, A. L. SMITH, M. HANSEN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **49**, 259 (1963).
17. G. WEBSTER, Biochem. Biophys. Res. Com., **7**, 245 (1962).
18. G. B. PINCHOT, M. HARMANSKI, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **48**, 1970 (1962).
19 G. P. BRIERLEY, E. BACHMAN, D. E. GREEN, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, *48*, 1928 (1962).

COMPARAREA UNOR METODE DE DOZARE A FOSFOCREATINEI MUSCULARE ÎN DIFERITE CONDIȚII EXPERIMENTALE

DE

CORNELIU MEDEȘAN

Dintre metodele curente de dozare a fosfocreatinei*) în mușchi, amintim atît metoda preconizată de C. H. Fiske, Y. Subbarow [2] și K. Lohmann [3], cît și pe cea indicată de A. M. Alexeeva [4].

Se știe că, după Fiske-Subbarow și K. Lohmann, fosfocreatina se extrage din mușchiul înghețat și mojarat în aer lichid prin adăugarea unei soluții apoase de acid tricloracetic 5%, care totodată asigură și deproteinizarea. După filtrare se dozează „fosforul determinabil direct" și „fosforul anorganic real", iar diferența lor reprezintă fosforul fosfocreatinei.

După metoda preconizată de A. M. Alexeeva, pulberea obținută după mojararea mușchiului înghețat cu aer lichid, se adaugă sub agitare la o soluție puternic acidă de molibdat de amoniu, care determină descompunerea și transformarea fosfocreatinei în creatinină și acid fosforic. Creatinina astfel obținută se determină fotometric, prin reacția Jaffe cu acid picric în mediu alcalin.

În timp ce în metodele de mai sus fixarea mușchiului se realizează prin înghețarea lui cu azot lichid, L. Jendrassik și J. Faiszt [5] au propus fixarea mușchiului prin introducerea lui într-o soluție de hidroxid de sodiu 10%, la temperatura camerei, dozînd apoi fosfocreatina, în principiu, după tehnica propusă de A. M. Alexeeva.

Înlocuirea aerului lichid prin soluția de hidroxid de sodiu, cu care se lucrează la temperatura camerei, prezintă evident un avantaj și, de aceea, ne-am gîndit să aplicăm acest procedeu în cadrul cercetărilor noastre.

Deși L. Jendrassik și J. Faiszt afirmă că fixarea mușchiului cu hidroxid de sodiu 10% dă rezultate comparabile cu cele obținute prin înghețarea cu azot lichid, totuși în lucrarea lor nu sînt prezentate datele experimentale din care să se poată constata gradul de apropiere dintre rezultatele ce se obțin prin cele două metode. Mai mult, se constată că L. Jendrassik

---

* În privința denumirii fosfocreatinei și altor „fosfageni", ca fosfoarginina, fosfotaurociamina, fosfoglicociamina, fosfolombricina, A.H. Ennor și J.F. Morrison [1] au atras atenția că prefixul „fosfo" ar fi mai corect să fie înlocuit cu „fosforil", substanțele de mai sus primind denumiri de: N-fosforilcreatina, N-fosforilarginina, N-fosforiltaurociamina, N-fosforilglicociamina și N-fosforilombricina. Totuși, termenul de fosfocreatină, avînd întrebuințare curentă, îl vom folosi și în această lucrare.

şi J. Faiszt au lucrat pe muşchi de broască curarizată, iar A. M. Alexeeva pe muşchi de şobolan alb, în prealabil anesteziat. De aceea, am considerat necesar să comparăm datele ce se obţin pe acelaşi material, pe de o parte prin tehnica preconizată de L. Jendrassik şi J. Faiszt, iar pe de altă parte prin metoda preconizată de A. M. Alexeeva.

Dozarea fosfocreatinei după metoda A. M. Alexeeva s-a efectuat astfel: muşchii gastrocnemieni de broască s-au prelevat cît mai repede posibil şi s-au mojarat în azot lichid, pînă la obţinerea unui praf fin. Aproximativ 0,5 g din praful îngheţat s-au introdus într-un pahar care conţinea 10 ml soluţie de molibdat de amoniu 0,7% în acid sulfuric 1 N, apoi s-a agitat şi cîntărit. Soluţia de molibdat în acid sulfuric pe de o parte scindează fosfocreatina din muschi, cu formare de creatinină care trece în soluţie, iar pe de altă parte precipită proteinele. După 40 minute s-a filtrat, iar în soluţia obţinută s-a determinat creatinina, cu ajutorul reacţiei de culoare cu acid picric. Pentru aceasta, la 1 ml de filtrat s-au adăugat 1,5 ml de hidroxid de sodiu 10% şi 3 ml de soluţie saturată de acid picric, după 10 minute aducîndu-se cu apă distilată la 25 ml. Extincţiile probelor au fost citite la fotometrul Pulfrich, utilizînd filtrul S 53 (533 mμ) şi cuva d = 1,999 cm. Ca martor a servit o soluţie de picrat alcalin, obţinută în condiţii identice, cu deosebirea însă că în loc de filtratul acid s-a adăugat 1 ml soluţie de molibdat în acid sulfuric. Din valorile extincţiilor, s-a determinat creatinina cu ajutorul unei curbe etalon. Deoarece muşchiul normal conţine o cantitate mică de creatinină preexistentă, aşa numita „creatinină preformată", precum şi alte substanţe care dau reacţie de culoare cu acidul picric [4], acestea trebuiau determinate într-o altă experienţă, de control, efectuată în paralel. Pentru aceasta, din praful de muşchi rămas de la proba anterioară s-au luat aproximativ 0,5 g, într-un pahar fără solutie de molibdat, care s-a introdus pentru 10—15 minute într-un termostat. Fosfocreatina se scindează fermentativ în creatină şi acid fosforic, prin participarea sistemului adenilic, fără formarea creatininei. S-au adăugat în pahar 10 ml molibdat de amoniu 0,7% în acid sulfuric 1 N, celelalte operaţii decurgînd ca şi în experienţa de bază. Cantitatea de creatinină rezultată din fosfocreatină s-a obţinut prin scăderea cantităţii de creatinină determinată în experienţele de control din cea găsită în experienţa principală. Exprimarea rezultatelor s-a făcut în mg creatinină pe gram muşchi.

În cazul aplicării tehnicii lui L. Jendrassik şi J. Faiszt, muşchii gastrocnemieni prelevaţi s-au introdus fiecare într-un pahar ce conţinea 5 ml hidroxid de sodiu 10%. După 2 minute, muşchii s-au tăiat mărunt cu o foarfecă, apoi, la 10 minute de la introducerea în hidroxidul de sodiu, s-au omogenizat cu ajutorul unui omogenizator Potter. Omogenatul s-a trecut într-un cilindru gradat şi s-a adus cu apă distilată la 20 ml. Determinarea fosfocreatinei în omogenatul alcalin s-a efectuat, în principiu, după metoda A. M. Alexeeva. Pentru aceasta, din omogenatul alcalin de muşchi (concentraţia NaOH 2,5%), lăsat timp de 30 minute în repaus, s-au luat cîte 4 ml în 2 eprubete. După neutralizarea conţinutului cu 0,16 ml acid sulfuric 40%, s-a adăugat 1 ml molibdat de amoniu 8% în acid sulfuric 5 N, s-a lăsat în repaus timp de 40 minute, apoi s-au filtrat proteinele precipitate. La 3 ml filtrat s-a adăugat 1,8 ml hidroxid de sodiu 10% şi apoi 4 ml acid picric saturat 3/4. După alte 10 minute, s-a completat cu apă distilată pînă la 10 ml şi s-a fotometrat la fotometrul Pulfrich, utilizînd filtrul S 53 (533 mμ) şi cuva d = 0,999 cm.

Experienţele noastre au fost efectuate pe loturi de 10—15 broaşte (*Rana ridibunda*), capturate în tot cursul anului. Muşchii simetrici au fost izolaţi cît mai repede posibil şi s-au prelucrat ulterior, unul după tehnica lui I. Jendrassik şi J. Faiszt (fixarea cu hidroxid de sodiu 10%), iar celălalt după metoda A. M. Alexeeva (fixare cu azot lichid). În acest fel, datele obţinute în cursul diferitelor experienţe puteau fi comparate între ele, deşi conţinutul în fosfocreatină muscular prezenta variaţii de la animal la animal.

După cum rezultă din tabela nr.1, dozările de fosfocreatină efectuate după tehnica lui L. Jendrassik și J. Faiszt în mușchii gastrocnemieni ai broaștelor normale, în repaus, dau valori apropiate de cele care se obțin cu metoda A. M. Alexeeva, fiind însă în general ceva mai mari, în medie cu 12%.

Tabela nr. 1

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de la broaște în repaus

Data	Mușchi drept. Tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt (NaOH 10%)		Mușchi stîng. Metoda A. M. Alexeeva (azot lichid)		$\Delta = a - b$
	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
20.XII.1961	2,67	4,98	2,37	4,42	0,30
22.XII.1961	2,89	5,39	2,25	4,20	0,64
22.XII.1961	2,79	5,20	2,31	4,32	0,48
26. I.1962	2,57	4,79	2,36	4,40	0,21
7.II.1962	2,40	4,48	2,13	3,97	0,27
8.II.1962	2,52	4,70	2,50	4,66	0,02
10.V.1962	2,70	5,04	2,37	4,42	0,33
6.VII.1962	2,71	5,06	2,48	4,63	0,23
Media	2,65	4,95	2,34	4,37	0,31

Deși această diferență sistematică pare a nu fi prea mare, totuși s-a pus problema dacă nu cumva ea se datorește modului de fixare a mușchiului înainte de analiză, deoarece procedeul analitic propriu-zis fiind practic același în ambele cazuri nu ar putea cauza diferența semnalată. Pentru a scoate în evidență care din cei doi factori, și anume : temperatura joasă sau alcalinitatea, condiționează diferențele menționate între datele analitice, am efectuat cîteva analize comparative pe mușchii simetrici, dintre care unul a fost tratat și analizat conform tehnicii lui J. Jendrassik și J. Faiszt, iar celălalt, în prealabil înghețat în azot lichid, a fost apoi trecut în mediu alcalin și analizat după aceeași tehnică.

Din datele experimentale se constată că, la mușchiul fixat cu soluție de hidroxid de sodiu 10%, valorile fosfocreatinei sînt în medie cu 12% mai mari decît în cazul mușchiului care, înainte de a fi introdus în hidroxid de sodiu, a fost înghețat în azot lichid. Reiese, așa dar, că diferențele menționate se datoresc temperaturii joase la care s-a lucrat (tabela nr. 2).

S-ar părea deci că pentru determinarea fosfocreatinei din mușchii de broaște normale, aflați în repaus, care după cum se știe [6—9] au un nivel ridicat de fosfocreatină, pot fi utilizate cu rezultate satisfăcătoare, ambele metode. Totuși, pentru ca să fie completă comparația, era necesar să se efectueze dozări comparative și în cazul mușchilor supuși în prealabil la excitații, caz în care se știe că fosfocreatina scade [10—13]. Aceasta, pentru a ne asigura dacă, indiferent de metoda folosită — L. Jen-

Tabela nr. 2

Valorile fosfocreatinei obţinute după tehnica lui L. Jendrassik şi J. Faiszt din muşchii gastrocnemieni de la broaşte în repaus

Data	Muşchi drept introdus direct în NaOH 10%		Muşchi stîng îngheţat în azot lichid apoi introdus în NaOH 10%		$\Delta = a - b$
	Creatinina a = mg/g muşchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g muşchi (calculat)	Creatinina b = mg/g muşchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g muşchi (calculat)	
29.VI.1961	1,84	3,43	1,75	3,26	0,09
9.II.1962	2,59	4,83	2,17	4,05	0,42
9.II.1962	2,13	3,97	1,82	3,39	0,31
21.II.1962	2,29	4,27	2,03	3,79	0,26
21.II.1962	2,35	4,38	1,93	3,60	0,42
21.II.1962	2,05	3,82	1,79	3,34	0,26
22.I .1962	1,90	3,54	1,60	2,98	0,30
22.II.1962	2,46	4,59	2,25	4,18	0,22
Media	2,20	4,10	1,91	3,57	0,28

drassik şi J. Faiszt, sau A. M. Alexeeva — se păstrează între ele aceleaşi diferenţe relativ mici.

În acest scop, broaştele s-au imobilizat pe o planşetă de lemn, cu ajutorul unor cordoane din elastic, astfel încît picioarele să rămînă libere pentru executarea contracţiilor. Excitaţiile s-au realizat cu ajutorul unui cronaximetru TUR-RS 3, folosindu-se un tren de 30 de impulsuri rectangulare pe minut, un curent continuu de 5 mA timp de 2 minute. Pentru efectuarea excitaţiilor s-a folosit procedeul imaginat de E. Macovschi, C. Iordache şi C. Dragomirescu [9] : electrozii, din fir de argint clorurat, s-au fixat direct pe picior, la extremităţile muşchiului gastrocnemian, piciorul celălalt (neexcitat) servind ca martor. Imediat după excitare, s-au retezat ambele picioare şi s-a determinat fosfocreatina, la unele broaşte după tehnica L. Jendrassik şi J. Faiszt, iar la altele după metoda A. M. Alexeeva.

S-a constatat însă că în cazul muşchiului supus *in situ* excitaţiilor electrice directe, fără exercitare de efort mecanic, valorile comparative ale fosfocreatinei obţinute cu ajutorul celor două metode sînt complet diferite. Astfel, din datele cuprinse în tabela 3 reiese că tehnica L. Jendrassik şi J. Faiszt dă valori ale fosfocreatinei de aproape trei ori mai mari decît cele găsite prin metoda A. M. Alexeeva (tabela nr. 3).

În continuare, ne-am propus să urmărim dacă diferenţele obţinute atunci cînd folosim excitarea electrică se păstrează şi în cazul cînd fosfocreatina musculară se scindează datorită eforturilor fiziologice.

Pentru aceasta, s-au efectuat o serie de determinări ale fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni ai unor broaşte care au fost silite să execute mai multe sărituri, timp de 2 minute, după care se instalează oboseala musculară, evidenţiată prin suprimarea reflexului de redresare. Fosfocreatina a fost determinată în condiţiile descrise mai sus.

Datele experimentale cuprinse în tabela nr. 4 arată că şi în acest caz există diferenţe mari în ceea ce priveşte nivelul fosfocreatinei.

Tabela nr. 3

Fosfocreatina din mușchii gastrocnemieni de broască *(Rana ridibunda)* supuși *in situ* excitațiilor directe, fără exercitare de efort mecanic. Curentul folosit este de 5 mA; durata excitării 2 minute, cu un tren de impulsuri rectangulare (30 impulsuri minut)

Data	Mușchi excitat dr.		Mușchi neexcitat stg.		$\Delta = a - b$
	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
	Tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt				
6.V.1962	1,71	3,19	2,09	3,90	0,38
6.V.1962	2,23	4,16	2,89	5,39	0,66
6.V.1962	2,15	4,01	2,55	4,76	0,40
6.V.1962	1,72	3,21	2,07	3,86	0,35
Media	1,95	3,64	2,40	4,48	0,45
	Metoda A. M. Alexeeva				
6.V.1962	0,42	0,78	2,00	3,73	1,58
6.V.1962	1,00	1,86	2,30	4,29	1,30
6.V.1962	0,45	0,84	2,64	4,92	2,19
6.V.1962	0,82	1,53	1,95	3,64	1,13
Media	0,67	1,25	2,22	4,12	1,55

Tabela nr. 4

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemien i de la broaște obosite

Data	Mușchi drept Tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt (NaOH 10%)		Mușchi stîng Metoda A. M. Alexeeva (azot lichid)		$\Delta = a - b$
	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
6.V.1962	1,63	3,04	0,68	1,26	0,95
6.V.1962	1,42	2,65	0,70	1,30	0,72
8.V.1962	1,70	3,17	0,69	1,28	1,01
8.V.1962	1,59	2,96	0,83	1,55	0,76
13.V.1962	1,82	3,31	0,77	1,43	1,05
13.V.1962	1,85	3,45	0,55	1,02	1,30
13.V.1962	2,00	3,73	0,83	1,55	1,17
13.V.1962	1,73	3,22	1,08	2,01	0,65
Media	1,71	3,19	0,76	1,42	0,95

Aceleași diferențe s-au constat și în cazul folosirii metodei Fiske-Subbarow și K. Lohmann, față de care tehnica lui L. Jendrassik și J. Faiszt indică un conținut crescut de fosfocreatină.

În continuarea experiențelor noastre, s-a căutat un mijloc pentru înlăturarea substanțelor care, în condițiile tehnicii de fixare a mușchiului

cu hidroxid de sodiu 10%, dau reacția de culoare cu acidul picric și care, evident, nu sînt reprezentate de creatinină. De aceea, ne-am propus să aplicăm în cazul extractelor musculare folosite de noi tehnica de absorbție specifică [14] a creatininei pe reactiv Lloyd. S-a procedat, în principiu, conform metodei lui J. A. Owen, Betty Yggo, F. J. Scandrett, C. P. Stewart [15], care au utilizat-o la determinarea creatininei din plasmă, ser și urină. Mai recent, în 1961, A. Marty, R. Nordmann și J. Nordmann [16] au folosit-o, cu anumite modificări, pentru determinarea creatininei rezultate din fosfocreatina musculară.

În condițiile noastre experimentale, adsorbția pe reactiv Lloyd s-a efectuat după următorul procedeu : în cazul metodei A. M. Alexeeva, 1 ml filtrat acid s-a adăugat peste 0,1 g reactiv Lloyd aflat într-un tub de centrifugă. După o agitare de 10 minute, s-a centrifugat 10 minute la 5000 ture pe minut, după care supernatantul a fost îndepărtat. Picratul alcalin necesar dezvoltării reacției de culoare s-a preparat extemporaneu din 5,5 ml hidroxid de sodiu 2,5 N și 27,5 ml soluție saturată de acid picric, aducîndu-se la 100 ml. Din această soluție s-au adăugat 7,5 ml în tuburi, peste sediment, s-a agitat 10 minute și s-a centrifugat din nou 10 minute. Valoarea extincției supernatantului obținut s-a determinat la fotometrul Pulfrich, filtrul S 53 (533 mμ), d = 0,5 cm. Pentru trasarea curbei etalon s-a procedat la fel ca mai sus, cu deosebirea că în loc de 1 ml extract muscular s-au introdus în tuburile de centrifugă cantitățile de creatinină conținute într-un ml soluție pregătită la fel ca în metoda A. M. Alexeeva.

În experiențe efectuate în paralel cu filtratele acide obținute cu ajutorul tehnicii L. Jendrassik și J. Faiszt, s-au adăugat peste 0,1 g reactiv Lloyd 3 ml filtrat acid, în rest procedeul fiind cel expus anterior. Trasarea curbei etalon de creatinină s-a făcut și în acest caz cu soluții standard de creatinină, care era absorbită pe reactiv Lloyd în condiții experimentale identice.

Tabela nr. 5

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de la broaște în repaus obținute în condițiile adsorbției creatininei pe reactiv Lloyd

Data	Mușchi drept Tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt cu varianta adsorbției creatininei pe reactiv Lloyd		Mușchi stîng Metoda A. M. Alexeeva cu varianta adsorbției creatininei pe reactiv Lloyd		$\Delta = a - b$
	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
25.I.1962	2,53	4,72	2,02	3,77	0,51
26.I.1962	3,02	5,63	1,72	3,21	1,30
26.I.1962	2,44	4,55	2,10	3,92	0,34
7.II.1962	2,30	4,29	2,00	3,73	0,30
8.II.1962	2,63	4,91	2,45	4,57	0,18
8.II.1962	2,29	4,27	2,04	3,80	0,25
Media	2,53	4,72	2,05	3,83	0,48

Din tabela nr. 5 se remarcă diferența care există între cantitățile de fosfocreatină din mușchii gastrocnemieni de broască, determinate cu ajutorul celor două tehnici de fixare, însă folosind adsorbția creatininei pe

reactiv Lloyd. Din tabela nr. 5 se constată că și la folosirea acestui procedeu de adsorbție metoda L. Jendrassik și J. Faiszt dă un plus de fosfocreatină, de același ordin de mărime cu cel găsit în experiențele anterioare.

De asemenea, din tabela nr. 6 se remarcă faptul că fosfocreatina este într-o cantitate mai mică în mușchiul care a fost mai întîi introdus în azot lichid și apoi în hidroxid de sodiu 10%, decît în mușchiul care a fost fixat inițial cu hidroxid de sodiu 10%.

Tabela nr. 6

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de la broaște în repaus, obținute după tehnica lui L. Jendrassik și J. Faiszt în condițiile adsorbției creatininei pe reactiv Lloyd

Data	Mușchi drept introdus direct în NaOH 10%		Mușchi stîng înghețat în azot lichid apoi în NaOH 10%		$\Delta = a - b$
	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
9.II.1962	2,86	5,34	2,34	4,36	0,52
9.II.1962	2,31	4,32	1,78	3,32	0,53
21.II.1962	2,07	3,86	2,22	4,14	−0,15
21.II.1962	2,12	3,95	1,80	3,35	0,32
21.II.1962	2,35	4,38	1,67	3,11	0,68
21.II.1962	1,78	3,32	1,65	3,11	0,13
22.II.1962	1,80	3,36	1,53	2,85	0,27
22.II.1962	2,58	4,81	2,58	4,81	0,00
Media	2,23	4,16	1,94	3,63	0,29

Rezultă că folosirea adsorbției pe reactiv Lloyd în condițiile mușchilor excitați sau obosiți nu modifică rezultatele anterioare (tabelele nr. 7 și 8). Se pare că reactivul Lloyd își pierde specificitatea în ce privește adsorbția creatininei numai în cazul fixării cu hidroxid de sodiu 10% a unui mușchi excitat, deoarece în acest caz se adsorb pe acest reactiv și alte substanțe decît fosfocreatina.

Din cele expuse, se desprind următoarele concluzii:

Cercetările efectuate pe mușchi proveniți de la broaște în repaus arată că tehnicile de dozare a fosfocreatinei, propuse de A. M. Alexeeva, L. Jendrassik și J. Faiszt, precum și de Fiske-Subbarow și K. Lohmann duc practic cam la aceleași rezultate. De aici ar putea să apară tentația de a folosi oricare din aceste tehnici, pentru cercetarea modificărilor fosfocreatinei în diferite condiții de excitație a mușchilor.

Faptul că pe mușchii excitați sau obosiți se obțin valori diferite, și anume că tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt indică valori ale fosfocreatinei mai mari față de celelalte două metode, dovedește că în această tehnică intervin unii factori, de natură încă nelămurită, care modifică rezultatele.

Tabela nr. 7

Fosfocreatina din mușchii gastrocnemieni de broască *(Rana ridibunda)* supuși *in situ* excitațiilor electrice directe fără exercitare de efort mecanic. Curentul folosit este de 5 mA, durata de excitare 2 minute, cu un tren de impulsuri rectangulare (30 impulsuri/minut)

Data	Mușchi excitat dr.		Mușchi neexcitat stg.		$\Delta = a - b$
	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
	Tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt, cu adsorbția creatininei pe reactiv Lloyd				
6.V.1962	1,43	2,66	1,87	5,35	0,44
6.V.1962	2,07	3,86	3,05	5,69	0,98
6.V.1962	2,00	3,73	2,44	4,55	0,44
6.V.1962	1,72	3,21	2,00	3,73	0,28
Media	1,80	3,36	2,34	4,83	0,53
	Metoda A. M. Alexeeva, cu adsorbția creatininei pe reactiv Lloyd				
6.V.1962	0,47	0,87	1,84	3,43	1,37
6.V.1962	0,64	1,19	2,08	3,88	1,44
6.V.1962	0,48	0,89	2,02	3,77	1,54
6.V.1962	0,74	1,38	2,23	4,16	1,49
Media	0,58	1,08	2,04	3,81	1,46

Tabela nr. 8

Valorile fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de la broaște obosite

Data	Mușchi drept Tehnica L. Jendrassik și J. Faiszt (NaOH 10 %) cu varianta adsorbției creatininei pe reactiv Lloyd		Mușchi stîng Metoda A. M. Alexeeva (azot lichid) cu varianta adsorbției creatininei pe reactiv Lloyd		$\Delta = a - b$
	Creatinina a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	Creatinina b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatina mg/g mușchi (calculat)	
6.V.1962	1,27	2,37	0,47	0,87	0,80
6.V.1962	1,42	2,65	0,49	0,91	0,93
8.V.1962	2,04	3,80	0,55	1,02	1,49
8.V.1962	1,60	2,97	0,80	1,49	0,80
13.V.1962	1,82	3,31	0,73	1,37	1,09
13.V.1962	1,92	3,58	0,57	1,06	1,35
13.V.1962	2,00	3,73	0,80	1,49	1,20
13.V.1962	1,73	3,20	1,00	1,86	0,73
Media	1,72	3,20	0,67	1,26	1,05

Varianta propusă de noi, şi anume utilizarea adsorbţiei pe reactiv Lloyd a creatininei rezultate din scindarea fosfocreatinei în condiţiile metodei A. M. Alexeeva, poate fi folosită cu succes pentru determinarea fosfocreatinei din muşchii striaţi.

Prezentată la redacţie
la 23 septembrie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.

BIBLIOGRAFIE

1. A. H. ENNOR, J. E. MORRISON, *Biochemistry of the phosphagens and related guanidines*, Physiol. rev., **38**, *4*, 631 (1958).
2. C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, *The colorimetric determination of phosphorus*, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
3. K. LOHMANN, *Über die Isolierung verschiedener natürlichen Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit*, Biochem. Z., **194**, 306 (1928).
4. A. M. АЛЕКСЕЕВА, *К вопросу о превращении креатинфосфата в креатинин и о новом методе определения креатинфосфата*, Биохимия, **16**, *2*, 97—103 (1951).
5. L. JENDRASSIK, J. FAISZT, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion*, Ann. Sci. Budapest., Rolando Eötvös nom. Sect. Biol., *1*, 133 (1957).
6. P. EGGLETON, G. P. EGGLETON, *Further observations on phosphagen*, J. Physiol. **65**, 15 (1928).
7. A. H. ENNOR, H. ROSENBERG, *The determination and distribution of phosphocreatine in animal tissue*, Biochem. J., **51**, 606 (1952).
8. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcţionale ale muşchiului*, St. cercet. biochimie, **IV**, *2*, 207—218 (1962).
9. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate şi excitabilitate musculară*, St. cercet. biochimie, **IV**, *2*, 171—185 (1961).
10. G. MARTINO, *The behaviour of phosphagen in muscular tetany*, C. A., **24**, 405 (1930).
11. G. LANGE, *Über die Dephosphorylierung von Adenosintriphosphat zu Adenosindiphosphat während der Kontraktionsphase von Froschrektusmuskeln*, Biochem. Z., **326**, 172 (1955).
12. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure in Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. II.*, Biochem. Z., **208**, 237—256 (1929).
13. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure in Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels III.*, Biochem. Z., **213**, 262—300 (1929).
14. O. H. GAEBLER, *Further studies of blood creatinine*, J. Biol. Chem., **89**, 451—466 (1930).
15. J. A. OWEN, BETTY YGGO, F. J. SCANDRETT, C. P. STEWART, *The determination of creatinine in plasma or serum and in urine; a critical examination*, Biochem. J., **58**, *3*, 426—437 (1954).
16. A. MARTY, R. NORDMANN, J. NORDMANN, *Recherches sur la biosynthèse de la créatinine à partir de la phosphocréatine.*, Bull. Soc. Chim. Biol., **XLIII**, *4*, 619—627 (1961).

ACȚIUNEA ANTICOLINESTERAZICĂ A UNOR SĂRURI CUATERNARE DE AMONIU DERIVATE DE LA O-, M-, P-FENILENDIAMINĂ ȘI BENZIDINĂ

DE

NATALIA MOLDOVEANU

Dată fiind importanța colinesterazei în transmisia neuromusculară, autori ca Harris și Harris (1), Merlen și Aubry [2], Hazard și col. [3], Blaschko și col. [4], Vincent și Parent [5], Grohman [6], Bergmann și col. [7] și alții [8—11] au cercetat modul de comportare al acestei enzime față de unele substanțe care modifică gradul de excitabilitate al țesuturilor, cum sînt sărurile cuaternare de amoniu. S-a găsit că activitatea colinesterazei este inhibată de majoritatea sărurilor cuaternare de amoniu; în anumite cazuri au fost chiar menționate unele legături între structura chimică și acțiunea anticolinesterazică a substanțelor respective, fără însă a se stabili relații precise între inhibiția colinesterazei, structura chimică și efectul curarizant al acestor substanțe.

În lucrarea de față am urmărit activitatea colinesterazei din serul de om în prezența unor săruri cuaternare de amoniu de tipul bis-onium acetil-derivaților o-, m-, p-fenilendiaminei și benzidinei *), pentru a constata dacă și în ce măsură aceste substanțe modifică activitatea enzimei menționate, și pentru a stabili eventualele relații între modificările survenite și structura chimică a substanțelor de mai sus.

Sărurile cuaternare de amoniu au fost împărțite în patru grupe:

Grupa A (Derivați ai o-fenilendiaminei)

I. Diclorura bis-(trimetilamoniu acetil)-o-fenilendiaminei
II. Diclorura bis-(trietilamoniu acetil)-o-fenilendiaminei
III. Diclorura bis-(metil piperidiniu acetil)-o-fenilendiaminei
IV. Diclorura bis-(etil piperidiniu acetil)-o-fenilendiaminei
V. Diclorura bis-(piridiniu acetil)-o-fenilendiaminei

Grupa B (Derivați ai m-fenilendiaminei)

I. Diclorura bis-(trimetilamoniu acetil)-m-fenilendiaminei
II. Diclorura bis-(trietilamoniu acetil)-m-fenilendiaminei
III. Diclorura bis-(metil piperidiniu acetil)-m-fenilendiaminei
IV. Diclorura bis-(etil piperidiniu acetil)-m-fenilendiaminei
V. Diclorura bis-(piridiniu acetil)-m-fenilendiaminei

*) Acești derivați au fost sintetizați de Gheorghe și Schell [12], care ni i-au pus și nouă la dispoziție.

Grupa C (Derivați ai p-fenilendiaminei)

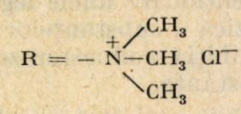
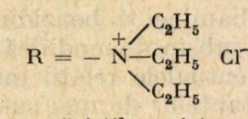
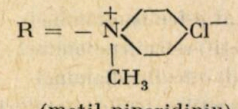
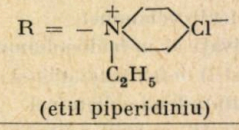
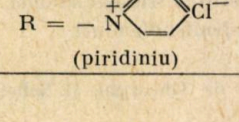
I. Diclorura bis-(trimetilamoniu acetil)-p-fenilendiaminei
II. Diclorura bis-(trietilamoniu acetil)-p-fenilendiaminei
III. Diclorura bis-(metil piperidiniu acetil)-p-fenilendiaminei
IV. Diclorura bis-(etil piperidiniu acetil)-p-fenilendiaminei
V. Diclorura bis-(piridiniu acetil)-p-fenilendiaminei

Grupa D (Derivați ai benzidinei)

I. Diclorura bis-(trimetilamoniu acetil)-benzidinei
II. Diclorura bis-(trietilamoniu acetil)-benzidinei

Tabela

Inhibiția (%) provocată de unele săruri cuaternare de amoniu derivate de la

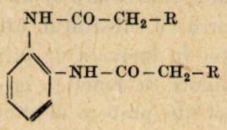
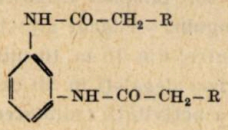
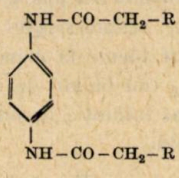
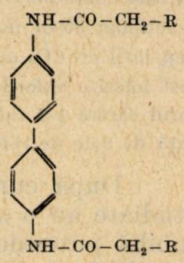
Nr. substanței	Radicalii	µg substanței în 3 ml amestec de reacție
I	 (trimetilamoniu)	2000 500 50 10
II	 (trietilamoniu)	2000 100 50 10
III	 (metil piperidiniu)	2000 500 50 5
IV	 (etil piperidiniu)	2000 500 50 10
V	 (piridiniu)	2000 500 50 10

III. Diclorura bis-(metil piperidiniu acetil)-benzidinei
IV. Diclorura bis-(etil piperidiniu acetil)-benzidinei
V. Diclorura bis-(piridiniu acetil)-benzidinei

Din punct de vedere structural, aceste substanțe se aseamănă între ele, deoarece au în molecula lor două grupări cuaternare de amoniu, între care sînt incluse două funcții amidice, precum și o formație de tip aromatic. Diferența dintre ele constă fie în poziția sterică a unor radicali

nr. 1

o-, m- și p-fenilendiamină și benzidină asupra colinesterazei din serul de om

			
Grupa A	Grupa B	Grupa C	Grupa D
100	100	80	90
94	94	49	87
91	90	17	50
75	71	9	13
82	97	63	85
67	88	42	81
24	69	27	35
3	26	20	10
100	100	88	100
99	97	80	93
93	83	43	77
94	36	15	34
95	100	95	80
87	95	90	80
90	95	55	67
80	83	27	47
94	97	99	100
90	32	90	91
62	27	70	84
38	12	55	72

100 = inhibiție totală a activității colinesterazei.

(—NH—CO—CH_2—R), fie în prezența numai a unuia sau a două nuclee aromatice în radicalul care leagă cei doi atomi cuaternari de amoniu, fie în diversitatea radicalilor prinși de atomul de azot cuaternar.

Activitatea colinesterazei a fost urmărită prin metoda Warburg, tehnica lui Ammon și Voss [13]. Ca sursă de enzimă — colinesteraza — am folosit serul sanguin (nehemolizat) de om, diluat 1/10 în soluție R_{30}[1]); ca substrat — clorură de acetilcolină dizolvată în soluție R_{30} (5 mg/ml), iar sărurile cuaternare de amoniu au fost folosite ca soluții în tampon de fosfați M/15, la un pH de 7,4, în concentrații care au variat între 10 și 2000 μg/ml. În partea centrală a vasului Warburg s-au introdus 1 ml ser sanguin diluat și 1 ml sol. de sare cuaternară de amoniu, iar în tubul lateral 1 ml sol. de acetilcolină. La probele de referință, în loc de soluție de sare cuaternară de amoniu s-a pus 1 ml sol. tampon. După ce sarea cuaternară de amoniu a acționat 30 de minute, asupra serului sanguin, s-a făcut amestecarea cu substratul. Citirile degajării de CO_2 au fost făcute la manometre, din 10 în 10 minute. În lucrarea de față au fost folosite valorile b_{30} (ml bioxid de carbon degajați în 30 de minute de reacție), cu ajutorul cărora s-a calculat inhibiția la sută a activității colinesterazei din probele de studiat, față de cele de referință.

După cum reiese din tabela nr. 1, sărurile cuaternare de amoniu studiate au o acțiune net anticolinesterazică. Unele din aceste substanțe inhibă puternic activitatea colinesterazei, în concentrație de 10 și chiar 5 μg în 3 ml amestec (compușii I, III și IV din grupa A; I și IV din grupa B, și V din grupa D).

În general, s-a găsit că nu toate variațiile structurii chimice ale acestor substanțe duc și la modificări ale activităților anticolinesterazice. Astfel, s-a constatat că atît derivații o-, m- și p-fenilendiaminei, cît și derivații benzidinei au o acțiune anticolinesterazică asemănătoare, deși aceștia din urmă au un ciclu aromatic în plus la radicalul de legătură.

În ceea ce privește activitatea anticolinesterazică a derivaților o-, m- și p-fenilendiaminei între ei, a izomerilor unde atomul de azot e cuaternizat cu același radical, se constată că substituirea în diverse poziții a radicalilor nu determină variații în același sens ale activității anticolinesterazice.

Analizînd activitatea anticolinesterazică a substanțelor cuprinse în aceeași grupă, în care diferențele de structură se datoresc radicalilor de la gruparea cuaternară, se constată că numai la compușii din grupa C și la cei din grupa D (cu excepția compusului II grupa D) are loc o creștere a activității anticolinesterazice în funcție de radicalii introduși, în sensul: trimetilamoniu < trietilamoniu < metil piperidiniu < etil piperidiniu. Compușii din grupele A și B nu prezintă însă creșterea activității anticolinesterazice în același sens.

Dacă se face o comparație între acțiunea anticolinesterazică a compușilor la care atomii de azot cuaternar fac parte dintr-un ciclu piridinic, cu activitatea lor biologică și interfacială (tabela nr. 2), se observă că doi dintre compușii cei mai activi din punct de vedere al activității biologice și interfaciale prezintă și o activitate anticolinesterazică marcantă (com-

[1]) 100 ml sol. NaCl 0,9%, 2 ml sol. KCl 1,2%, 2 ml sol. $CaCl_2$ 1,76% și 30 ml sol. $HNaCO_3$ 1,26%.

pusul V din grupa C și compusul V din grupa D). Activitatea celorlalți doi nu variază însă în același sens cu activitatea interfacială și biologică.

Se poate deci considera că anumite variații survenite în structura unora dintre sărurile cuaternare de amoniu studiate se repercutează asupra activității anticolinesterazice a acestora; concluzia însă nu poate fi extinsă asupra tuturor compușilor cercetați. De relevat este faptul că datele

Tabela nr. 2

Compararea activităților anticolinesterazică, farmacodinamică și interfacială a unor săruri cuaternare de amoniu

Activitatea	V grupa A (diclorura bis-(piridiniu acetil)-o-fenilen-diaminei)	V grupa B (diclorura bis-(piridiniu acetil)-m-fenilen-diaminei)	V grupa C (diclorura bis-(piridiniu acetil)-p-fenilen-diaminei)	V grupa D (diclorura bis-(piridiniu acetil)-benzi-dinei)
Anticolinesterazică (inhibiția % produsă de 10 μg substanță la probă)	38	12	55	72
Farmacodinamică (mg/kg corp)	250	200	125	7,5
Interfacială (1 mol/$x.10^4$ litri)	$x = 1,2$	$x = 1,5$	$x = 2$	$x = 14,2$

obținute în privința efectului net inhibitor al sărurilor cuaternare de amoniu studiate asupra colinesterazei concordă cu datele din literatură, care arată că majoritatea sărurilor cuaternare de amoniu prezintă o acțiune anticolinesterazică.

Prezentată la redacție
la 21 octombrie 1963

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.

BIBLIOGRAFIE

1. HARRIS M. S., HARRIS R. S., *Effect in vitro of curare alcaloids and crude curare preparations on true and pseudocholinesterase activity*, Proc. Soc. Exper. Biol., **56**, 223—225 (1944).
2. MERLEN J. F., AUBRY G., *Action de certains curarisants de synthèse sur la pseudocholinestérase sérique de l'homme*, C. R. Soc. Biol., **144**, 701 (1950).
3. HAZARD R., CHEYMOL J., CORTEGGIANI E., *Dissociation des effets anticholinestérasiques et des actions sensibilisantes sur l'acetylcholine produite par quelques curares de synthèse*, J. Physiol., **45**, 3, 511—519 (1953).
4. BLASCHKO H., BULBRING E., CHOU T. C., *Tubocurarin antagonism and inhibition of ChE*, Brit. J. Pharm., **4**, 29—32 (1949).
5. VINCENT D., PARENT M., *Action des alcaloïdes des curares sur les cholinestérases*, Bull. Soc. Chim. Biol., **36**, 405—410 (1954).
6. GROHMAN W., *Musklrelaxantien und Cholinesterase*, Arch. Klin. Chir., **285**, 210—229 (1957).

7. BERGMANN F., WILSON I. B., NACHMANSON D., *The inhibitory effect of stilbamidine, curare and related compounds and its relation to the active groups of cholinesterase. Action of stilbamidine upon the nerve impulse conduction*, Chem. Abstr., 1951, p. 4360 *a*.
8. BERGMANN F., WURFEL M., *Active surface of pseudocholinestrase and the possible role of this enzyme in conduction*, Chem. Abstr., 1952, p. 11281 *i*.
9. FOLDES F. F., BAART N., SHANOR P. S., ERDOES G. E., *The inhibitory effect of neuromuscular blocking agents and their antagonists of human cholinesterase*, în *Atti XI Congresso Società Italiana di anestesiologia, Simposio Internationale su Curaro-Curarisimili e Curarizzanti*, Venezia, 12—15 Settembre 1958, p. 511—519.
10. MOLDOVEANU N., *Acțiunea anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu*, Com. Acad. R.P.R., **VII**, *1*, 39—43 (1957).
11. SCHELL H. D., *Acțiunea antiacetilcolinică și anticolinesterazică a unor săruri cuaternare de amoniu derivate de la stilben*, St. cercet. biochimie, **VI**, *1*, 61—70 (1963).
12. GHEORGHE S., SCHELL H. D., *Săruri curarizante bis-cuaternare de amoniu cu funcții amidice. I. Bis-onium-acetil derivați ai o-, m-, p-fenilendiaminei, benzidinei și o-dianisidinei*, St. cercet. biochimie, **I**, *3*, 247—263 (1958).
13. AMMON R., VOSS G., *Die azethylcholinzertörende Wirkung des Blutes*, Pflügers Arch., **235**, 393—400 (1935).

INFLUENȚA TWEEN 80 ȘI A PENICILINEI ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ALE PERETELUI CELULAR LA MICOBACTERII

DE

EUG. PĂUNESCU, ANCA CIOLAC-NEGOESCU și GH. PISICĂ

La micobacterii, peretele celular prezintă o structură complexă, care îi conferă proprietăți fizice și chimice particulare. Studiile electrono-optice [1], [2], difracția cu raze X [3], [4], [5], adsorbția selectivă a coloranților [5], [6], izolarea și identificarea chimică a unor constituenți structurali [7], [8] etc. — au arătat că structura peretelui celular al bacteriilor acido-alcoolo-rezistente este predominant lipoprotidică, prezentînd o puternică polaritate negativă. Aceste caractere sînt deosebit de accentuate la micobacteriile virulente, care dau tuberculoza mamiferelor, peretele celular al acestora fiind constituit din trei straturi concentrice [18], cu structură lipoprotidică [19], care dau numeroase inele de difracție X. Stratul exterior este format din trehalozo-dimicolat („cord factor") puternic hidrofob [8]. La micobacteriile cu virulență atenuată și, în special la cele avirulente (b. paratuberculoși), se observă o densitate mult mai redusă a structurii peretelui celular, absența „cord factor"-ului și o sărăcie relativă a structurii peretelui celular.

Structura predominant lipoidică a peretelui celular conferă micobacteriilor — în afară de o hidrofobie accentuată — un important grad de impermeabilitate, care poate fi apreciat cu ajutorul „testului dehidrogenazic" cu albastru de metilen, descris de Bloch [9]. Reducerea albastrului de metilen de către dehidrogenazele celulare este mult mai lentă în cazul bacililor virulenți decît în cazul atenuaților sau, mai ales, al saprofiților, ceea ce denotă o impermeabilizare marcată a peretelui celular al bacililor virulenți. Dacă însă celula bacteriană virulentă este supusă unui tratament de scurtă durată cu eter de petrol, care îndepărtează stratul periferic de trehalozo-dimicolat, permeabilitatea peretelui celular crește mult, bacilul realizînd cu ușurință reducerea albastrului de metilen.

Aceste experiențe sugerează că solvenții lipidici, ca și detergenții pot influența permeabilitatea peretelui celular al micobacteriilor.

Studiul agenților ce pot mări permeabilitatea peretelui celular este important, deoarece adăugarea lor la mediul de cultură ar putea favoriza intensificarea schimburilor de metaboliți între celulă și mediu, grăbind ritmul de dezvoltare a bacteriilor și scurtînd, în felul acesta, perioada de timp necesară diagnosticului bacteriologic în tuberculoză.

Pentru aceste motive, am întreprins la micobacterii un studiu privind acţiunea asupra peretelui celular a Tween 80 (esterul polioxietilenic al sorbitolului cu acidul oleic), substanţă cu marcată activitate detergentă, netoxică *per se* faţă de bacterii şi deci utilizabilă în mediile de cultură pentru asemenea microorganisme.

★

O altă substanţă capabilă să influenţeze proprietăţile fizico-chimice ale peretelui celular al micobacteriilor este penicilina, antibiotic folosit pentru neutralizarea suprainfecţiilor cu alţi germeni, în produsele patologice destinate izolării bacilului tuberculozei.

Deoarece este important de cunoscut dacă utilizarea acestui antibiotic poate influenţa nu numai viabilitatea altor bacterii, ci şi capacitatea de multiplicare a bacilului tuberculozei, s-au întreprins unele cercetări în acest sens. Astfel, Uyeda şi Raffel [10], într-un studiu privind acţiunea concentraţiilor mari de penicilină (100—200 unităţi Oxford/ml), incluse la mediul de cultură pentru bacilul tuberculozei, constată că antibioticul are o slabă influenţă asupra dezvoltării bacililor virulenţi, provocînd însă inhibiţia dezvoltării mutanţilor atenuaţi sau avirulenţi ai aceloraşi bacili.

Într-o lucrare anterioară [11], întreprinsă pe un număr de 20 de tulpini de micobacterii cu variate grade de virulenţă şi chimiorezistenţă, noi am constatat de asemenea că tulpinile virulente sînt mai rezistente la acţiunea penicilinei decît mutanţii avirulenţi; am observat însă că tulpinile, saprofite, de bacili paratuberculoşi, prezintă o rezistenţă faţă de acest antibiotic încă mai marcată decît aceea a tulpinilor virulente.

După cum se ştie, penicilina inhibă — în mod obişnuit la toate bacteriile — procesul de formare a peretelui celular [12], [13], prin blocarea încorporării acizilor muramic şi diaminopimelic în mucopolizaharidul ce asigură rigiditatea peretelui celular (14). Ar fi deci posibil ca şi în cazul bacilului tuberculozei penicilina să provoace inhibiţia dezvoltării printr-un mecanism similar, de blocaj al formării structurii de bază a peretelui celular. Pe de altă parte, faptul că bacilii virulenţi — al căror perete celular are un grad mare de impermeabilitate — nu sînt prea sensibili la acţiunea penicilinei, ridică problema unei corelaţii între rezistenţa la acţiunea penicilinei şi permeabilitatea peretelui celular. În sfîrşit, mai este posibil ca această rezistenţă la acţiunea penicilinei să fie rezultatul producerii unei enzime inductive — penicilinaza — care să blocheze efectul nociv al antibioticului.

Pentru precizarea valorii acestor ipoteze am întreprins unele investigaţii, care fac obiectul acestei note.

În paralel cu studiul acţiunii Tween 80 asupra permeabilităţii peretelui celular al micobacteriilor, în lucrarea de faţă prezentăm rezultatele cercetărilor privind mecanismul de acţiune al penicilinei la nivelul structurilor peretelui celular.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru studiu am folosit în mod curent următoarele tulpini de micobacterii : *a*) *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* $H_{37}Rv$, virulentă, chimiosensibilă ; b) *Mycobacterium tuberculosis*, var. *bovis* BCG, cu virulență atenuată, chimiosensibilă ; c) *Mycobacterium smegmatis*, saprofită (paratuberculos), natural chimiorezistentă la unele tuberculostatice, sensibilă la penicilină.

Pentru determinarea sensibilității la penicilină și a producerii de penicilinază am folosit și alte tulpini : virulente (*Mycob. tuberculosis* var. *bovis* Vallée ; varianta streptomicino-rezistentă H_{37} . R-Str) ; atenuate (variantele chimiorezistente H_{37}.R-HIN, BCG.R-HIN. BCG. R-Str, BCG.R-Tb_1, BCG.R-1314, BCG.R-HIN.R-1314, BCG.R-HIN.R-Tb_1) ; avirulente (varianta $H_{37}Ra$ și b. paratuberculos *M. phlei*).

Culturile au fost realizate pe cartof, în mediu sintetic Sauton. La aceste culturi s-a adăugat, după caz, penicilină în concentrație de 200 Oxford/ml[1]) sau Tween 80 în concentrație de 0.5 mg ml.

Producerea de penicilinază a fost apreciată folosind cultivarea tulpinilor în prezență de penicilină, recoltarea sterilă a culturii de 15 zile și delipidarea acesteia cu acetonă (de 3 ori). Cîte 10 mg microb delipidat și uscat a fost apoi pus în contact cu cantități de 100 și 1000 u. Oxford penicilină. După 1, 2 și 24 de ore de contact la 37°C, cîte 0,1 ml din amestec a fost pus pe o cultură de 2—3 ore pe geloză (în placă Petri) de *Staphylococcus aureus*, tulpina Oxford. Pe aceeași placă cu cultură de stafilococ a fost pusă, concomitent, o cantitate egală din aceleași soluții de penicilină, însă neincubate cu bacili delipidați ; acestea au constituit „martorul".

Măsurarea zonei de abioză provocată de penicilină s-a făcut la 24 de ore de la însămînțarea mediului cu stafilococ.

Modificările de permeabilitate ale peretelui celular au fost apreciate cu ajutorul timpului de reducere a clorurii de trifeniltetrazoliu (CTT) de către o suspensie bacilară de concentrație cunoscută, în conformitate cu metoda descrisă anterior [15]. Am folosit glucoza ca substrat donator de hidrogen și concentrații egale de suspensii bacteriene, care au fost cultivate ori tratate în prealabil, după caz, cu Tween 80 sau cu penicilină. Ca martori de referință am utilizat aceleași sisteme de reacție, în care am înlocuit însă soluția de glucoză (donatorul de hidrogen) prin apă distilată.

Acțiunea penicilinei asupra structurii peretelui celular am controlat-o prin identificarea cromatografică a acidului α, ε-diaminopimelic (16), comparativ, la culturi bacilare cultivate în prezența și în absența penicilinei. Pentru cromatografiere am folosit hidrolizatele culturilor care au fost în prealabil delipidate (prin tratare cu acetonă la rece, de trei ori, la cîte 2 zile interval), uscate și apoi extrase la rece (4°C), pe rînd, timp de cîte 24 de ore, cu : *a*) soluție apoasă 10% de acid tricloracetic ; *b*) soluție apoasă 5% de acid tricloracetic ; *c*) alcool 96% ; *d*) eter. Final, corpii supuși acestui tratament în vederea eliminării componentelor solubile, neînglobate în structurile anatomice celulare [13], au fost uscați în vid.

Corpii extrași și uscați au fost apoi supuși unei hidrolize la 100°C, în acid clorhidric 6 N, la reflux, timp de 16 ore. Hidrolizatul a fost apoi neutralizat cu amoniac concentrat, filtrat și concentrat în vid.

Cromatograma s-a efectuat pe hîrtie Whatman nr. 1, folosind [2]) o dublă irigare :

---

[1]) La culturile de *Mycob. tuberculosis*, care necesită o perioadă mai lungă de timp pentru dezvoltare, cantitatea de penicilină a fost reînnoită la fiecare 5 zile, deoarece antibioticul este supus degradării spontane.

[2]) În baza experienței împărtășite de D. Stavri, cercetător științific în Secția de fiziologie bacteriană a Institutului de microbiologie, parazitologie și epidemiologie „Dr. I. Cantacuzino".

a) prima irigare, timp de 16—18 ore, cu solventul Partridge : 4 p. *n*-butanol + 1 p. acid acetic glacial + 5 p. apă distilată.

b) a doua irigare, timp de 10—12 ore, cu amestecul monofazic format din : 1 p. piridină + 8 p. metanol + 1,2 p. apă distilată + 0,2 p. acid clorhidric concentrat.

Ca martor am folosit un acid diaminopimelic, produs N.B.C., care conţinea atît izomerul *L* (cu migrare mai rapidă), cît şi izomerul *D* (cu migrare mai lentă).

Pentru developare (10 minute la 100°C), am folosit revelatorul cu ninhidrină (soluţie 0,2 % în *n*-butanol), care pune în evidenţă acidul diaminopimelic sub forma unui spot de culoare galbenă, cu uşoară nuanţă brună-verzuie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum s-a arătat într-o lucrare anterioară [11], penicilina, în concentraţii de 200 u. Oxford/ml, inhibă slab dezvoltarea pe medii solide a micobacteriilor virulente, inhibă mai puternic dezvoltarea mutanţilor avirulenţi şi, practic, nu are acţiune asupra dezvoltării micobacteriilor saprofite (tabela nr. 1).

Tween-ul 80, încorporat la mediul solid de cultură, nu exercită acţiune inhibantă asupra dezvoltării nici unei micobacterii. Inclus în medii de cultură lichide [17], însă, permite dezvoltarea rapidă şi abundentă a micobacteriilor în profunzimea mediului.

Activitatea penicilinazică (tabela nr. 1) a tulpinilor de micobacterii studiate este netă numai în cazul bacililor paratuberculoşi (*Mycob. smegmatis* şi *Mycob. phlei*). La nici una dintre tulpinile de micobacterii umane, indiferent de gradul lor de virulenţă sau de sensibilitatea la tuberculostatice, nu s-a putut pune în evidenţă o activitate penicilinazică.

Tabela nr. 1

Dezvoltarea micobacteriilor în prezenţa penicilinei şi producerea de penicilinază

Tipul de micobacterie	Dezvoltarea		Limitele diametrelor zonei de abioză (în mm) după 2 şi 24 ore de contact între corpii bacilari (sursă de penicilinază) şi soluţia de penicilină cu			
	în absenţă de penicilină (martor)	în prezenţă de penicilină (probă)	10 u. Oxford/ml		100 u Oxford/ml	
			martor	probă	martor	probă
Tulpini virulente (umane : H_{37} Rv şi H_{37} R-Str ; bovină : b. Vallée)	++++	+++±	14—18	12—15	17—20	14—21
Tulpini atenuate (H_{37} R—HIN ; BCG şi varianţele sale rezistente la HIN. Str., Tb_1 şi 1314 Th)	++++	+++	14—18	10—17	17—20	13—19
Mutanta avirulentă H_{37} Ra	++++	++	14—18	11—12	17—20	17—19
Tulpini saprofite (*Mycob. snegmatis* şi *Mycob. phlei*)	++++	++++	14—18	0	17—20	0

Trebuie subliniat că, așa cum se observă din tabela nr. 1, bacilii paratuberculoși (avirulenți), care manifestă cea mai mare rezistență la penicilină, sînt și singurii producători de penicilinază. Aceasta spre deosebire de mutanta H_{37} Ra, care este avirulentă, dar sensibilă la acțiunea penicilinei.

Tulpina H_{37} Ra, devenită avirulentă, nu dobîndește și capacitatea de a sintetiza penicilinază, proprietate prezentă la tulpinile avirulente saprofite (*Mycob. smegmatis* și *Mycob. phlei*); în schimb, sensibilitatea la penicilină a mutantei H_{37} Ra este mult mai mare decît aceea a tulpinii virulente de origine H_{37} Rv, ceea ce denotă o permeabilizare a peretelui său celular. Această modificare a structurii peretelui celular este de altfel probată și de „testele de virulență" [3], [4], care arată o structură periferică a celulelor de H_{37} Ra mai apropiată de aceea a tulpinilor saprofite (cu permeabilitate mare a peretelui celular) și net diferențiată de aceea a tulpinii virulente de origine [11].

Acțiunea Tween 80 și penicilinei asupra peretelui celular al micobacteriilor virulente și saprofite a fost cercetată atît prin includerea lor în mediul de creștere (tabela nr. 2) cît și prin tratarea suspensiilor bacilare cu aceste substanțe (1 oră la 37°C), înainte de efectuarea testului dehidrogenazic (tabela nr. 3).

Tabela nr. 2

Acțiunea penicilinei și Tween 80, incluse în mediul de cultură, asupra permeabilității peretelui celular pentru dehidrogenaza glucozei

Tulpina	Activitatea dehidrazică (în μg formazan format de echivalentul a 1 mg microb uscat)		
	Cultură martor (în mediu fără adaos)	Cultură în mediu cu adaos de penicilină	Cultură în mediu cu adaos de Tween 80
Mycob. tuberculosis var. *hominis*, H_{37} Rv	0,83±0,15	2,86±0,33	6,4±0,4
Mycob. tuberculosis var. *bovis*, BCG	1,07±0,03	3,4±0,1	7,1±0,4
Mycob. smegmatis	2,38±0,05	9,7±0,25	11,8±0,15

Tabela nr. 3

Acțiunea penicilinei și Tween 80 — puse în contact (1 oră la 37°C) cu suspensia de bacili — asupra permeabilității peretelui celular pentru dehidrogenaza glucozei

Tulpina	Activitatea dehidrazică (în μg formazan format de echivalentul a 1 mg microb uscat)		
	Resting cells (în mediu fără adaos)	*Resting cells* în prezență de penicilină	*Resting cells* în prezență de Tween 80
Mycob. tuberculosis var. *hominis*, H_{37}Rv	0,83±0,15	0,80±0,2	3,45±0,05
Mycob. tuberculosis var. *bovis*, BCG	1,07±0,03	1,11±0,15	5,32±0,1
Mycob. smegmatis	2,38±0,05	2,25±0,03	6,83±0,2

După cum se observă din tabela nr. 2, atît Tween 80 cît şi penicilina, incluse în mediul de cultură, măresc permeabilitatea peretelui celular al micobacteriilor. Acelaşi efect se obţine cu Tween 80 chiar şi numai în urma simplului contact cu suspensia bacilară, în timp ce penicilina nu poate realiza creşterea permeabilizării prin contactul direct cu celula bacilară în fază de nemultiplicare (*resting cell*) (tabela nr. 3).

Rezultatele obţinute indică deci că Tween 80 acţionează nemijlocit asupra structurilor periferice ale peretelui celular, în timp ce penicilina are o acţiune indirectă, pe cale metabolică, inducînd modificări ale structurii peretelui celular în cursul sintezei acestuia.

Determinarea prezenţei acidului α, ε-diaminopimelic (*AcDAP*) în componentele structurale ale celulei micobacteriilor a fost făcută cu scopul de a constata dacă acţiunea penicilinei asupra metabolismului acestor celule provoacă inhibarea sintezei mucocomplexului care conţine AcDAP şi formează structura de bază a peretelui celular bacterian. O inhibare a sintezei acestui mucocomplex ar trebui să ducă la imposibilitatea de a pune în evidenţă AcDAP în structura peretelui celular.

Rezultatele analizelor cromatografice întreprinse în acest scop au arătat însă prezenţa AcDAP atît în structurile provenite de la bacilii normali cît şi în cele de la bacilii cultivaţi în prezenţa penicilinei, indiferent de faptul dacă aceştia din urmă reacţionează prin producere de penicilinază (*Mycob. smegmatis*) sau nu sintetizează această enzimă (*Mycob. tuberculosis* H_{37} Rv).

Pe cromatogramă, spoturile de AcDAP provenite din hidrolizatul bacililor cultivaţi normal sînt mai mari decît cele provenite de la bacilii cultivaţi în prezenţă de penicilină. Eluarea spoturilor cu cîte 5 ml amestec de butanol şi metanol şi compararea fotometrică a intensităţii culorilor dezvoltate a arătat de asemenea diferenţe, în sensul unui conţinut mai redus în AcDAP al hidrolizatelor de bacili cultivaţi în prezenţă de penicilină.

Un rezultat mai precis asupra acestei diferenţe de conţinut în AcDAP considerăm că va putea fi obţinut cu ajutorul unui eşantion de substanţă marcată radioactiv, determinînd rata de încorporare a AcDAP (marcat) într-o aceeaşi cultură de micobacterii, ţinută în absenţă sau în prezenţă de penicilină.

Rezultatele obţinute sugerează deci că permeabilizarea peretelui celular în cursul dezvoltării micobacteriilor în prezenţa penicilinei este rezultatul inhibării parţiale a înglobării AcDAP în structura de bază a peretelui celular bacilar.

CONCLUZII

Cultivarea micobacteriilor în prezenţă de Tween 80 sau de penicilină duce la dezvoltarea unor bacili cu permeabilitate crescută a peretelui celular (apreciată compartiv prin testul de reducere a clorurii de trifeniltetrazoliu).

În concentraţii de 0,05—0,1% Tween 80 nu numai că nu este toxic pentru celula bacilară, dar chiar accelerează ritmul de dezvoltare şi per-

mite creșterea micobacteriilor în profunzimea mediului de cultură. Penicilina, în concentrații mari (100—200 u. Oxford/ml), inhibă parțial dezvoltarea micobacteriilor tuberculoase avirulente, dar nu are acțiune asupra micobacteriilor saprofite. Acestea din urmă, cultivate în prezență de penicilină, sintetizează penicilinază, care neutralizează antibioticul.

Tween 80 are acțiune directă asupra structurii periferice a micobacteriilor, deoarece simplul contact al suspensiei celulare cu detergentul provoacă creșterea permeabilității peretelui celular.

Penicilina nu are acțiune directă asupra peretelui celular, ci numai prin intermediul metabolismului. Această acțiune pare să intereseze sinteza mucocomplexului ce constituie reticulul de bază al peretelui celular, deoarece penicilina inhibă parțial înglobarea acidului α, ε-diaminopimelic în acest mucocomplex.

Prezentată la redacție
la 9 iulie 1963

*Laboratorul de biochimie microbiană
al Institutului clinic de ftiziologie,
București*

BIBLIOGRAFIE

1. T. TODA, M. KOIKE, N. HIRAKI, K. TAKEYA, J. Bact. **73**, *2*, 442 (1957).
2. C. SHINOHARA, K. FUKUSHI, J. Bact., **74**, *3*, 413 (1957).
3. J. DESBORDES, *Diagnostic bactériologique des Mycobactéries*, Edit. Masson, Paris, 1951.
4. F. FOURNIER, C. R. Acad. Sci., **231**, 339 (1950).
5. J. DESBORDES, E. FOURNIER, F. FOURNIER, E. ROSENBERG, Ann. Inst. Pasteur, **97**, *3*, 307 (1959).
6. J. DESBORDES *et al.*, Amer. Rev. Tuberc., **66**, 382 (1952); Ann. Pharmac., **12**, 361 (1954); *Résumés du VII-e Congrès International de Microbiologie*, Stockholm, 1958, nr. 7 C.
7. E. LEDERER, *II-e Congrès International de Biochimie, Symposion sur le Métabolism Microbienne*, Paris, 1952, p. 5; *Exposés Annuels de Biochimie médicale*, 20-e série, Edit. Masson, Paris, 1958.
8. H. BLOCH, E. SORKIN, H. ERLENMEYER, Amer. Rev. Tuberc., **67**, 629 (1953).
9. H. BLOCH, Bull. N. Y. Acad. Med., **26**, 506 (1950).
10. C. T. UYEDA, S. RAFFEL, Amer. Rev. Resp. Dis., **80**, 6, 849 (1959).
11. EUG. PĂUNESCU, G. ALGEORGE, AL. ESKENASY, A. CIOLAC, GH. PISICĂ, Probleme de tuberculoză, 1963, vol. IV, p. 89
12. E. LEDERBERG, Proc. Nat. Acad. Sci. N. Y., **42**, 574 (1956).
13. L. MESROBEANU, E. PĂUNESCU, *Bakterrinaia fiziologhiia*, ed. II, Edit. Meridiane, București, 1963.
14. J. SALTON, Bacteriol. Rev., **25**, *2*, 77 (1961).
15. EUG. PĂUNESCU, St. cercet. biochimie, **5**, *4*, 587 (1962).
16. D. S. HAORE, E. WORK, Biochem. J., **61**, 562 (1955).
17. EUG. PĂUNESCU, P. GEORGESCU, Ftiziologia, *2*, 141 (1958).
18. M. KOIKE, K. TAKEYA, J. Biophys. Biochem. Cytol., **9**, 597 (1961).
19. K. TAKEYA, R. MORI, T. TOKUNAGA, M. KOIKE, K. HISATSUNE, J. Biophy. Biochem. Cytol., **9**, 496 (1961).

INFLUENȚA UNUI PREPARAT DE ADN ASUPRA CREȘTERII ȘI PIGMENTAȚIEI COLEOPTILELOR DE GRÎU

DE

P. RAICU și M. ELIAS

Influența acidului dezoxiribonucleic (ADN) asupra diferitelor procese biologice la plante a fost observată de mai mulți cercetători. Printre altele s-a dovedit că ADN are o influență însemnată asupra creșterii și morfogenezei plantelor. Într-o lucrare anterioară [10] am prezentat primele noastre cercetări privind această influență asupra creșterii plantelor de grîu din soiurile Arnăut de Nemerci (*Triticum durum Desf.*) și Marquis (*T. aestivum* L.).

În ultima vreme am întreprins cercetări referitoare la influența ADN extras din embrioni din soiul Arnăut asupra creșterii și pigmentației coleoptilelor de grîu din soiul Lutescens 62 (*T. aestivum* L.). În literatura de specialitate nu există decît puține date privind influența directă a ADN asupra creșterii coleoptilelor [3], [11], iar în ceea ce privește influența asupra pigmentației lor, datele lipsesc complet. Există unele cercetări care au arătat influența unor substanțe înrudite cu ADN asupra pigmentației plantelor. Astfel Butenko și Ceailahian (4), prin tratamentul cu un amestec de nucleozide, au observat apariția unui pigment roșu în rădăcinile de Ipomaea (Vil.), iar Bamberger și Meyer [2] prin tratamentul cu kinetină, au provocat apariția pigmentului roșu la plăntuțele de *Amaranthus retroflexus*, crescute la întuneric.

MATERIAL ȘI METODĂ

În cercetările noastre s-a folosit un preparat de ADN extras din embrioni de grîu din soiul Arănut de Nemerci. Metodele de obținere a embrionilor și de extracție a ADN au fost descrise într-o lucrare anterioară [5].

Tratamentul s-a efectuat la boabe de grîu de mărime aproximativ egală, din soiul Lutescens 62, spălate sub curent de apă timp de 3 ore. Pentru tratament s-au folosit soluții de ADN cu concentrațiile 0,02, 0,04 și 0,06%. Soluțiile au fost dozate cu ajutorul reactivului Dische. Preparatul de ADN este solvit în soluție de clorură de sodiu 0,14 M.

Boabele de grîu au fost introduse în soluțiile de ADN de diferite concentrații sau, în cazul martorilor, în apă sau soluție de NaCl 0,14 M, după care s-au pus într-un exsicator și s-au supus procesului de vacuum-infiltrație. După scoaterea din exsicator, boabele s-au păstrat

în soluțiile respective sau în apă pînă a doua zi, la temperatura de 5°C, după care au fost puse la germinat pe hîrtie de filtru umectată, în vase de sticlă cu capac rodat. La vîrsta de 8 zile plăntuțele s-au scos din vase și au fost uscate în etuvă la 60°C. După uscare, coleoptilii s-au detașat cu mîna și au fost măsurați și supuși extracției pigmentului după metoda dată de Bamberger și Meyer [2]. Colorimetrarea s-a făcut într-un colorimetru Pulfrich, la lungimea de undă 540 mμ. Grosimea stratului de absorbție d = 12 mm. Rezultatele sînt prezentate în unități de extincție, raportate la 1 cm lungime de colcoptil și la 0,01 g substanță uscată.

REZULTATE

Tratamentul boabelor de grîu din soiul Lutescens 62 cu soluții de diferite concentrații de ADN extras din embrionii de grîu din soiul Arnăut de Nemerci, și dizolvat în NaCl 0,14 M a influențat creșterea coleoptilelor și a provocat apariția unei pigmentații roșii în coleoptile (figura 1).

Analiza comparativă a lungimii coleoptilelor la materialul tratat și la martori arată că sub influența tratamentului a avut loc o inhibiție a creșterii la concentrațiile de 0,02% g și 0,06%g ADN. La concentrația de 0,04 g% ADN acest fenomen nu a fost observat (tabela nr. 1).

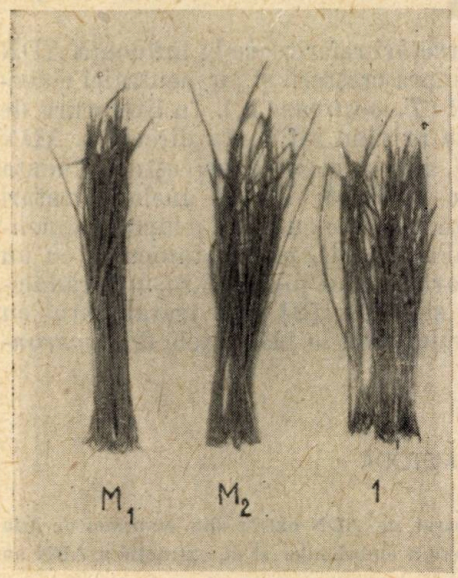


Fig. 1. — Intensificarea pigmentației coleoptilelor de grîu prin tratamentul cu ADN. M_1 = plăntuțe provenite din boabe tratate cu clorură de sodiu; M_2 = plăntuțe provenite din boabe tratate cu clorură de sodiu V m infiltrate *1* — plăntuțe provenite din boabe tratate cu ADN solvit în clorura de sodiu (vacuum infiltrat).

Cantitatea de pigmenți în coleoptile, calculată la 1 cm de lungime coleoptil sau la 0,01 g greutate uscată, a variat aproximativ în sens invers cu lungimea coleoptilelor, fiind mai mare la concentrațiile de 0,02 și 0,06g% ADN și mai redusă la concentrația 0,04 g% ADN.

Curba ce reprezintă variația lungimii coleoptilelor este complementară cu curba ce reprezintă variația cantitativă a pigmenților roșii la diferite concentrații de ADN. Aceasta arată că există o corelație inversă între lungimea și pigmentația coleoptilelor în funcție de tratamentele efectuate (figura 2).

DISCUȚII

Influența ADN asupra creșterii plantelor sau a țesuturilor din culturi a fost studiată de mai mulți cercetători [3], [4], [6], [11—14] care au obținut rezultate similare cu ale noastre.

Tabela nr. 1

Influența tratamentului cu ADN asupra creșterii și pigmentației coleoptilelor de grîu din soiul Lutescens 62

Tratament	Lung. coleopt. M ± m	Diferența (în %) față de martorul 1	Diferența (în %) față de martorul 2	Cantitatea de pigmenți în unități extincție/ml	Diferența (în %) față de martorul 2	Cantitatea de pigmenți în unități extincție/0,01 g	Diferența (în %) față de martorul 2
H_2O (martor 1)	3,66±0,06	100,00	98,65	—	—	—	—
NaCl (martor 2)	3,71±0,07	101,36	100,00	1,46	100,00	0,25	100,00
0,02 g% ADN	2,48±0,07	67,76	66,85	3,14	215,06	0,70	281,60
0,04 g% ADN	3,77±0,06	103,00	101,62	2,13	145,89	0,46	184,00
0,06 g% ADN	2,61±0,01	71,31	70,35	3,07	210,10	0,53	212,00

În ceea ce privește apariția pigmentației coleoptilelor, trebuie remarcat că acest fenomen a fost observat de unii cercetători [4], [2] în urma tratamentului cu substanțe ca : nucleozidele, kinetina, clorura mercurică etc., iar în experiențele noastre el apare și la martorul tratat cu NaCl. Aceasta arată că nu este vorba de un efect specific tratamentului cu ADN.

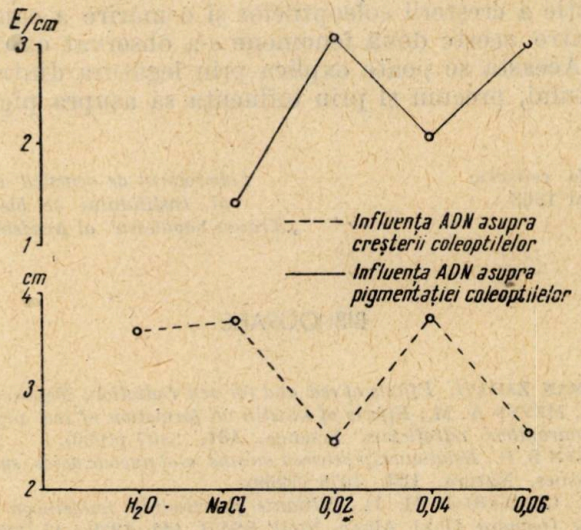


Fig. 2. — Influența *ADN* asupra creșterii și pigmentației coleoptilelor.

Structura chimică a pigmentului roșu care apare în plante sub influența tratamentelor menționate nu este bine cunoscută, însă în general se consideră că ar fi de natură antocianică [1]. Influența tratamentului cu ADN asupra pigmentației s-ar putea deci explica prin legătura dintre ADN și metabolismul azotului din plante, la nivelul substanțelor antocianice.

Unele cercetări [1], [6] [8] [9] au demonstrat existenţa în plante a unor pigmenţi fotomorfogenici cu rol în creşterea şi morfogeneza acestora şi cu o sensibilitate însemnată la radiaţiile roşii şi infraroşii. Datorită acestor pigmenţi fotomorfogenici, sub acţiunea radiaţiilor roşii creşterea plantelor este stimulată, în timp ce sub influenţa radiaţiilor infraroşii creşterea lor este inhibată. Pe baza acestor cercetări se poate presupune că în experienţele noastre apariţia pigmentului roşu, eliminînd din spectru lumina roşie, prin reflectarea ei, a inhibat acţiunea stimulatoare a pigmenţilor fotomorfogenici. Aceasta explică corelaţia inversă între lungimea şi pigmentaţia coleoptilelor, din experienţele noastre, şi sensul invers al curbelor care reprezintă variaţia acestor două proprietăţi în funcţie de concentraţia tratamentului cu ADN.

CONCLUZII

Cercetările noastre privind influenţa tratamentului cu ADN de diferite concentraţii, extras din embrionii de grîu din soiul Arnăut de Nemerci, asupra plăntuţelor de grîu din soiul Lutescens 62, au arătat că are loc o inhibiţie a creşterii coleoptilelor şi o mărire a cantităţii de pigmenţi roşii. Între aceste două fenomene s-a observat existenţa unei corelaţii inverse. Aceasta se poate explica prin legătura dintre ADN şi metabolismul azotului, precum şi prin influenţa sa asupra pigmenţilor fotomorfogenici.

Prezentată la redacţie
la 22 mai 1963

Laboratorul de genetică vegetală
al Institutului de biologie
„Traian Săvulescu" al Academiei R.P.R.

BIBLIOGRAFIE

1. AVISHAG KADMAN ZAHAVI, *Effects of red and far red radiation*, Nature, **180**, 492 (1957).
2. BAMBERGER E., MEYER A. M., *Effects of kinetin on formation of red pigment in seedlings of Amaranthus retroflexus*, Science, **131**, 3407 (1960).
3. BISWAS B. B., SEN S. P., *Relationship between auxins and nucleic acids synthesis in coleoptile tissues*, Nature, **183**, 4678 (1959).
4. BUTENKO R. G., CEAILAHIAN M. H., *Vliianie proizvodnih nukleinogo obmena na rost i ţvetenie Ipomaea*, Dokl. Alkad. Nauk SSSR, **141**, 1239—42 (1961).
5. ELIAS M., Extragerea unui preparat de ADN din cantităţi reduse de embrioni de grîu. Studii şi cercetări de biochimie **4**, 579 (1963).
6. HENDRICKS S. B., TOOLE E. H., BORTWICK H. A., *Photocontrol of plant development by the simultaneous excitations of two interconvertibles pigments. Control of seed germination and axis elongation*, Botan Gaz., **121**, 1—8 (1959).
7. HILDEBRANDT A. C., RIKER A. J., MUIR E., *Growth in vitro of marigold and tobacco tissue with nucleic acids and related compounds*, Plant Physiol., **32**, 3 (1957).
8. HILLMAN W. S., *Nonphotosynthetic light requirement in Semina and its partial satisfaction by kinetin*, Science, **126**, 3265 (1957).
9. MILLER C. O., *Similarity of some kinetin analogs and red light effects*, Plant Physiol., **31**, 318 (1956).

10. RAICU P., ELIAS, M., *Symposium on genetics and wheat greeding*, Martonvasar, Hungary, 1962.
11. SILBERGER S., SKOOG F., *Relationship between auxin and nucleic acids synthesis in coleoptile tissues*, Science, **118**, 443 (1953).
12. SATAROVA N. A., *Vliianie nukleinovîh kis'ot. adenina i 2—4 D na rost kulturî t kanu gladiolusa*, Fiziol. rastenia, Akad. Nauk SSSR, *8*, 301—17 (1961).
13. SORMOVA Z., *Nekolik biochemiskych uzhledy stimulace vyvoje rostlin*, Pozfroviy Ceskoslov Akad. Ved., **71**, 1—19 (1961).
14. VASIL I. K., *Cultivation of excised anthers in vitro. Effect of nucleic acids*, J. Exp. Bot., **10**, *30*, 399 (1959).

FOSFORUL ANORGANIC ŞI EXOSMOZA LUI DIN MUŞCHI ÎN DIFERITE STĂRI DE EXCITABILITATE ŞI EFORT

DE

TRAIAN RĂDULESCU, DITA COTARIU şi LORA SCOLNIC

Studiul biochimic al contracţiei musculare în condiţii diferite de excitabilitate şi efort a format obiectul unor lucrări, ale căror rezultate sînt uneori contradictorii. Astfel, Nachmansohn [1], [2], lucrînd pe muşchiul gastrocnemian de broască în tetanos, găseşte că la aceeaşi efectuare de lucru, descompunerea fosfocreatinei în muşchiul curarizat (cu excitabilitate redusă) este mai mică decît în muşchiul necurarizat şi că există o relaţie directă între efortul mecanic şi scăderea fosfocreatinei.

Cercetările făcute la Institutul nostru de acad. Macovschi, Iordache şi Dragomirescu [3] pe muşchii gastrocnemieni de broască in situ, deci în condiţii cît mai apropiate de activitatea musculară normală, au arătat că între gradul de descompunere a fosfocreatinei şi excitabilitatea muşchiului nu există o legătură directă, iar descompunerea fosfocreatinei nu este condiţionată de travaliul extern efectuat de muşchi.

Dat fiind concluziile diferite ale autorilor menţionaţi, se impunea continuarea cercetărilor în această problemă.

De aceea, am reluat aceste cercetări în condiţii de lucru oarecum deosebite, care ni se par că ar corespunde mai bine acestui scop, prin determinarea fosfatului anorganic şi fosfatului difuzat din muşchi în diferite stări de excitabilitate şi efort.

Este admis astăzi că sursa de energie pentru activitatea musculară rezultă direct sau indirect prin desfacerea ATP-ului şi, indirect, din desfacerea fosfocreatinei şi că acest proces se efectuează cu eliberare de fosfat anorganic. Se ştie de asemenea, că în anumite stări funcţionale ale muşchiului intervin procese biochimice ce conduc la sinteza fosfocreatinei din creatină sau creatinină şi fosfat [4].

Deplasarea echilibrului dintre compusul fosforic energetic şi produsele sale de scindare, într-un sens sau altul (scindare sau sinteză), va determina în mod corespunzător modificarea conţinutului de fosfat anorganic din muşchi. Fosfatul anorganic avînd o greutate moleculară relativ mică, este capabil să difuzeze prin membrana fibrei musculare în spaţiile interfibrilare şi de aici, cu foarte mare uşurinţă, într-o soluţie salină fără fosfat în care muşchiul este introdus şi din care poate fi dozat uşor pe cale colorimetrică.

Embden și colab. [5], care au pus pentru prima dată în evidență fenomenul difuziei fosfatului, au arătat că eliminarea de fosfat crește apreciabil cînd mușchiul este supus în prealabil unei excitări electrice și au explicat acest fapt prin creșterea permeabilității mușchiului excitat față de aceea a celui normal.

În opoziție cu aceste concluzii, Gellhorn (citat după Magat) [6] susținea că viteza de difuzie nu ar depinde numai de permeabilitatea celulară, ci și de concentrația fosfatului anorganic din interiorul celulei, iar Cardoso (citat după Magat) [6] admitea că eliminarea crescută de fosfat s-ar datora scindării fosfocreatinei în creatină și fosfat. Este foarte probabil ca viteza exosmozei fosfatului să fie determinată atît de permeabilitate, cît și de gradientul de concentrație a fosfatului anorganic.

Într-o lucrare anterioară [7] noi am arătat că această metodă poate fi utilizată ca test pentru caracterizarea și controlul stării mușchiului înainte și după excitarea electrică. Astfel, s-a constatat că un curent electric puternic produce o alterare a mușchiului ce determină o modificare de durată a permeabilității, în timp ce un curent electric slab nu produce această modificare sau ea este de scurtă durată.

În aceste condiții, o variație în viteza exosmozei produsă de o excitare cu un curent electric slab ar urma să fie determinată doar de gradientul de concentrație al fosfatului anorganic. Pentru verificarea acestui punct de vedere s-a urmărit, în paralel, atît difuzia fosfatului anorganic cît și conținutul său în mușchi.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe broaște (*Rana ridibunda*) capturate în jurul Bucureștiului în perioada septembrie—noiembrie 1961 și aprilie—iulie 1962.

Experiențele au fost efectuate pe mușchiul gastrocnemian in situ, la temperatura laboratorului, broasca fiind fixată la o placă de lemn, prin legături elastice, cu aproximativ 10—15 minute înainte de experiență. A fost evitată orice acțiune prealabilă asupra animalului, capabilă să influențeze biochimismul muscular, ca : distrugerea măduvei spinării, decapitare, anestezie, răcire etc. Picioarele posterioare, tăiate simultan, au fost înghețate în azot lichid, în vederea dozării fosfatului anorganic liber din mușchi, după procedeul Lohmann-Fiske-Subbarow, în condițiile stabilite în laboratorul nostru [3]. În cazul în care s-a urmărit dozarea fosfatului anorganic difuzat, mușchii erau izolați, fără lezare, în timpul cel mai scurt posibil și introduși imediat în 7 ml soluție salină preparată după Jendrassik [8]. După o extracție de 2—3 ore la temperatura camerei (20° ± 2°C), în condiții de aerare, se doza fosfatul extras din mușchi după procedeul menționat într-o lucrare anterioară [7].

Modificarea de excitabilitate a mușchiului s-a obținut prin curarizarea broaștei cu flaxedil, iar contracția cu travaliu a fost efectuată prin legarea unei greutăți de piciorul posterior al broaștei, la nivelul tendonului mușchiului supus unei excitări electrice.

Excitarea electrică a mușchiului in situ s-a făcut cu ajutorul unui tren de impulsuri rectangulare produs de un cronaximetru tip „TU R-RS$_3$", electrodele nepolarizabile de argint clorurat fiind fixate la nivelul extremităților mușchiului gastrocnemian in situ.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În cercetarea noastră am pornit de la constatarea că muşchii gastrocnemieni simetrici cedează, în volume egale de soluţie Ringer şi în timpuri egale, cantităţi practic egale de fosfat anorganic. Totodată, a fost pusă în evidenţă concordanţa în conţinutul de fosfat anorganic liber din aceşti muşchi [tabela nr. 1].

Tabela nr. 1

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină, din muşchii gastrocnemieni de broască în stare normală
(muşchi stîng = *S*; muşchi drept = *D*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g)		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină (în γ P/muşchi)		Greutatea muşchilor supuşi exosmozei (în g)	
S	*D*	*S*	*D*	*S*	*D*
280	272	13	15,5	0,65	0,60
256	300	16,5	15,5	0,80	0,80
288	252	13	17	0,70	0,70
248	260	15,5	13,5	0,65	0,65
316	296	28	27	0,80	0,80

Aceasta ne permite urmărirea efectului unui tratament pe aceeaşi broască, fără a mai fi nevoiţi să lucrăm pe loturi de broaşte şi să aplicăm calculul statistic.

Pentru cercetarea comportării muşchiului curarizat faţă de muşchiul necurarizat, era necesar să stabilim în prealabil, dacă există concordanţă atît în conţinutul în fosfat anorganic din muşchii simetrici ai aceleiaşi broaşte curarizate, cît şi în exosmoza fosfatului anorganic. Pentru aceasta s-a procedat în felul următor : s-a injectat în sacul dorsal al broaştei 1 ml soluţie flaxedil $2^0/_{00}$ şi după instalarea efectului curarizării (la circa 15 min de la injecţie), s-au tăiat simultan picioarele posterioare.

Din datele obţinute s-a putut constata, pentru muşchii gastrocnemieni simetrici ai broaştei curarizate, o concordanţă satisfăcătoare în ambele cazuri (tabela nr. 2).

Pentru a putea compara pe aceeaşi broască, comportarea muşchiului curarizat faţă de muşchiul necurarizat, era necesar să se împiedice curarizarea unuia din cei doi muşchi gastrocnemieni ce urma să servească drept martor. Acest lucru s-a putut obţine prin legarea arterei de la un picior posterior al broaştei. La acelaşi rezultat s-a ajuns şi prin legarea exterioară a piciorului cu un nod dublu de sfoară, deasupra muşchiului gastrocnemian.

Din rezultatele obţinute reiese că conţinutul în fosfat anorganic liber este mai mic la muşchiul curarizat, reprezentînd în medie 67% din valoarea celui din muşchiul necurarizat (tabela nr. 3). De asemenea, muşchiul curarizat (cronaxia crescută) cedează soluţiei saline mai puţin fosfat decît muşchiul simetric, necurarizat, al aceleiaşi broaşte.

Tabela nr. 2

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină, din muşchi gastrocnemieni de broască curarizată cu flaxedil

(Muşchi sting = *S*; Muşchi drept = *D*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g muşchi)		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină (în γ P/muşchi)		Greutatea muşchilor supuşi exosmozei (în g)	
S	*D*	*S*	*D*	*S*	*D*
250	268	6,5	7,5	1,3	1,3
284	301	32,5	30	1,00	1,1
265	298	42,5	45	1,25	1,20
305	330	94	82	0,75	0,65
238	253	8,5	9,5	1,05	1,0

Tabela nr. 3

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină, din muşchi gastrocnemieni de broască, un muşchi fiind curarizat iar celălalt muşchi simetric, normal

(Muşchi curarizat = *C*; Muşchi normal = *N*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g muşchi)		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină (în γ P/muşchi)		Greutatea muşchilor supuşi exosmozei (în g)		Obs.
N	*C*	*N*	*C*	*N*	*C*	
838	597	27	16	0,40	0,50	
766	586	33	17	0,50	0,50	Picior legat cu nod dublu
828	310	89	70	0,45	0,40	
1108	757	85	64	0,60	0,55	Arteră legată
697	571	102	76	0,30	0,30	
—	—	34	21	0,50	0,50	
Valoarea medie faţă de martor (*N*)	67%		67%			

Scăderea conţinutului în fosfat anorganic liber din muşchiul curarizat, poate fi pusă pe seama sintezei fosfocreatinei din creatină şi fosfat, iar scăderea fosfatului difuzat s-ar putea explica tocmai pe baza acestei modificări a gradientului său de concentraţie. Afirmaţia lui Bordi [9] că cronaxia creşte paralel cu scindarea fosfocreatinei nu se verifică deci în curarizare.

În ceea ce priveşte comportarea celor doi muşchi simetrici supuşi in situ la o excitare concomitentă identică, datele obţinute arată, după cum era de aşteptat, o concordanţă mulţumitoare pentru fosfatul anorganic (tabela nr. 4).

Acum se putea trece la experienţele propriu-zise pentru urmărirea scindării compuşilor fosforici energetici în muşchiul normal şi curarizat,

ambii mușchi simetrici fiind supuși in situ unei excitări electrice identice. Pentru aceasta, s-a procedat la curarizarea broaștei, în condițiile de mai înainte, unul din mușchii gastrocnemieni fiind împiedicat să se curarizeze prin legarea arterei sau legarea exterioară a piciorului cu nod dublu. După instalarea efectului de curarizare, asupra unuia din cei doi mușchi simetrici, ambii mușchi au fost excitați direct în condiții identice (3 minute cu 5 mA și 40 imp/minut). După excitare s-au tăiat simultan ambele picioare și s-au prelucrat atît pentru determinarea conținutului în fosfat anorganic liber din mușchi, cît și a fosfatului difuzat în soluție salină (tabela nr. 5).

Tabela nr. 4

Fosfatul anorganic liber din mușchii gastrocnemieni de broască excitați in situ, în aceleași condiții cu un tren de impulsuri de 5 mA, 50 imp./minut timp de 2 minute
(mușchi stîng = *S*; mușchi drept = *D*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g mușchi)	
S	*D*
726	743
643	608
635	614

După cum reiese din tabela nr. 5, valorile pentru fosfatul anorganic liber și difuzat din mușchiul curarizat și excitat sînt mai mici, în medie fiind 75% din valoarea corespunzătoare din mușchiul simetric excitat în condiții identice, dar necurarizat. Această valoare este destul de apropiată de valoarea procentuală a fosfatului din mușchiul curarizat față de cel normal (67%). Faptul constatat nu prezintă deci nimic surprinzător, dat fiind

Tabela nr. 5

Fosfatul anorganic liber și fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină din mușchii gastrocnemieni de broască, un mușchi fiind curarizat și excitat electric, iar celălalt mușchi simetric excitat în aceleași condiții dar necurarizat. Excitare cu un tren de impulsuri de 5 mA, 40 imp./minut, timp de 3 minute,
(mușchi excitat = *E*; mușchi curarizat și excitat = *C, E*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g mușchi)		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină (în γ P/mușchi)		Greutatea mușchilor supuși exosmozei (în g)	
E	*C, E*	*E*	*C, E*	*E*	*C, E*
700	604	55	48	0,45	0,45
800	506	42	31	0,55	0,50
618	483	34	21	0,40	0,35
500	372	77	62	0,35	0,40
—	—	70	63	0,3	0,3
Valoarea medie față de martor (E)	75%		78%		

că înainte de excitare nivelul inițial al fosfatului din mușchiul curarizat era deja mai scăzut decît nivelul inițial al fosfatului din mușchiul simetric necurarizat, așa după cum a fost arătat mai înainte (tabela nr. 3).

Dacă scăderea excitabilității mușchiului, obținută prin curarizare, ar influența gradul de scindare a fosfocreatinei, și anume ar determina o îngrădire pronunțată a scindării — așa după cum afirmă Nachmansohn [1] — aceasta ar trebui să se reflecte în modificarea valorii procentuale a fosfatului din mușchiul curarizat față de cel normal, necurarizat, și anume ar trebui să producă o micșorare a valorii sale.

În condițiile noastre de lucru ar fi însemnat să se obțină pentru fosfatul anorganic din mușchiul curarizat și excitat o valoare medie inferioară valorii medii de 67% constatată la mușchiul curarizat. În realitate nu se constată această scădere, ci chiar o ușoară creștere a nivelului fosfatului (75% față de 67%); deci, nu poate fi cazul unei micșorări a gradului de scindare a fosfocreatinei. În același sens se comportă și fosforul anorganic difuzat din mușchi.

În concluzie, modificarea excitabilității mușchiului prin curarizare nu determină micșorarea gradului de scindare a fosfocreatinei produsă sub acțiunea unei excitări electrice.

În cercetările legate de al doilea obiectiv al lucrării de față, și anume: comportarea mușchiului in situ, în contracția izotonică cu efectuare de lucru mecanic extern, am urmărit de asemeni componenta fosforică (fosfat anorganic) pe mușchii gastrocnemieni simetrici ai aceluiași animal.

În felul acesta s-a cercetat exosmoza fosfatului anorganic și conținutul în fosfat anorganic din mușchiul supus contracției cu travaliu, atît față de mușchiul în repaus, cît și față de mușchiul supus contracției în gol (fără travaliu). Pentru a putea da o justă interpretare rezultatelor, se impunea în prealabil urmărirea efectului tensionării mușchiului asupra conținutului și difuziei fosfatului anorganic din mușchi.

Tensionarea mușchiului s-a făcut prin legarea de partea de jos a mușchiului gastrocnemian drept al broaștei fixate la placă a unei greutăți. Piciorul stîng a fost imobilizat. După 15 minute de tensionare cu 50 g, s-au tăiat simultan ambele picioare și s-au prelucrat, pentru determinarea atît a conținutului în fosfat anorganic liber, cît și a exosmozei fosfatului. Valoarea fosfatului anorganic liber și a fosfatului anorganic difuzat din mușchiul tensionat nu diferă față de mușchiul martor netensionat, ceea ce denotă că nu s-a produs în mușchi nici o reacție chimică cu eliberare de fosfat (tabela nr. 6).

Acest fapt concordă cu constatarea lui Hill [10] după care un mușchi în repaus rezistă la întindere doar prin forțe pur elastice și vîscoase. În această situație se putea trece la cercetarea comportării mușchiului în contracție cu travaliu, față de mușchiul simetric în repaus sau în contracție în gol (fără travaliu).

În primul caz, un mușchi gastrocnemian al broaștei, tensionat in situ cu 20 g, a fost supus excitației electrice directe timp de 3 minute, la o intensitate de curent de 5 mA și 40 imp./minut, în timp ce celălalt mușchi simetric a rămas în repaus. După excitare, ambele picioare au fost tăiate simultan și cei doi mușchi prelucrați în vederea determinării fosfatului anorganic conținut în mușchi sau difuzat în soluția salină. După

cum era de aşteptat, atît conţinutul în fosfat anorganic, cît şi exosmoza fosfatului anorganic din muşchiul în contracţie cu travaliu sînt mai mari decît la muşchiul rămas în repaus (tabela nr. 7), ceea ce denotă o scindare a compusului fosforic macroergic în procesul contracţiei cu travaliu.

Tabela nr. 6

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină din muşchii gastrocnemieni de broască, un muşchi fiind tensionat in situ, iar celălalt muşchi normal

(muşchi normal = *N*; muşchi tensionat cu 50 g = *T*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g muşchi) Durata tensionrii : 15 min.		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină 0,7 % (în γ P/muşchi) Durata tensionării : 15 min.		Greutatea muşchilor supuşi exosmozei (în g)	
N	*T*	*N*	*T*	*N*	*T*
687	651	43,5	41,0	0,85	0,85
538	602	32,0	34,5	0,85	0,80
461	458	53,0	47,0	0,90	0,90
618	667	14,5	18,5	0,80	0,75
672	690	19,0	21,0	0,90	1,0

În cazul al doilea, un muşchi al broaştei, tensionat in situ cu 50 g, respectiv 20 g, a fost supus excitării electrice directe timp de 3 minute, la o intensitate de curent de 5 mA, cu 50 imp./minut, iar celălalt muşchi si-

Tabela nr. 7

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină din muşchii gastrocnemieni de broască, un muşchi fiind supus contracţiei cu travaliu, iar celălalt muşchi simetric, în repaus. Excitare electrică cu tren de impulsuri de 5 mA, 40 imp./minut, timp de 3 minute

(*G* = greutata fixată la muşchi; muşchi în repaus = *R*; muşchi în contracţie cu travaliu = *T*)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g muşchi)		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină (în γ P/muşchi)		Greutata muşchilor supuşi exosmozei (în g)	
R	*T*	*R*	*T*	*R*	*T*
G = 20 g		*G* = 20 g			
321	596	27	32	0,95	0,90
319	576	10	20	0,80	0,90
248	703	28	67	0,90	0,80
		7	12,5	0,90	1,0

metric netensionat, a fost doar excitat electric în aceleaşi condiţii. Indiferent de greutate, se constată că conţintul în fosfat anorganic liber din muşchiul care se contractă cu travaliu, este practic egal faţă de muşchiul care se contractă fără travaliu (tabela nr. 8).

Deci, în condiţiile noastre de lucru, în contracţie izotonică a muşchiului in situ, nu apare — la muşchiul care execută o contracţie cu tra-

valiu—o eliberare în plus de fosfat anorganic faţă de muşchiul în contracţie simplă, confirmîndu-se astfel rezultatele anterioare obţinute în laboratorul nostru [3].

Urmărirea componentei fosforice (fosfat anorganic) în muşchii gastrocnemieni simetrici in situ ai aceluiaşi animal de experienţă, ne-a permis studiul metabolismului compuşilor fosforici energetici în diferite stări funcţionale ale muşchiului.

S-a stabilit, în anumite condiţii de lucru, existenţa unui paralelism între conţinutul în fosfat anorganic din muşchi şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină, aşa încît studiul exosmozei ne poate da unele informaţii asupra mersului reacţiilor chimice în muşchi.

Din datele experimentale obţinute, rezultă că starea de excitabilitate a muşchiului nu influenţează gradul de scindare al fosfocreatinei şi că travaliul extern al muşchiului nu determină o eliberare în plus de fosfat anorganic, confirmîndu-se primele concluzii ale unor lucrări anterioare (3).

Tabela nr. 8

Fosfat anorganic liber din muşchii gastrocnemieni de broască, un muşchi fiind în contracţie cu travaliu, iar celălalt muşchi simetric în contracţie simplă. Excitare electrică cu tren de impulsuri 5 mA, 50 imp./minut timp de 2 minute

(G = greutate ; muşchi în contracţie simplă = E muşchi în contracţie cu travaliu = T)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g muşchi)			
E	*T*	*E*	*T*
G = 50 g		*G* = 20 g	
1005	930	686	703
682	705	638	633
850	1100	633	686
800	800	969	938
786	778	803	896
885	836		

Prezentată la redacţie
la 15 octombrie 1963

*Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.*

BIBLIOGRAFIE

1. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. I.*, Biochem. Z., **196**, 73—97 (1928).
2. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfoll der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. III.*, Biochem. Z., **213**, 262—300 (1929).
3. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate şi excitabilitate musculară*, St. cercet. biochimie, **IV**, *2*, 171 (1961).
4. O. CORI, A. TRAVERSO-CORI, M. LAGARRIGUE, F. MARCUS, *Enzymic phosphorylation of creatine by 1 : 3-diphosphoglyceric acid*, Biochem. J., **70**, 633 (1958).
5. G. EMBDEN, E. ADLER, *Über die physiologische Bedeutung des Wechsels Permeabilitätszustandes von Muskelfasergrenzschichten*, Hoppe-Seylers Zeitschrift für physiologische Chemie, **118**, 1—50 (1922).
6. N. A. MAGATH, E. I. SMAILOVSKAIA, M. I. KOLOMIETZ, *Zur Frage nach den Energiequellen der Tumorzelle. Untersuche über die Phosphatausscheidung vergifteter Tumor und Leberschnitte*, Ztschr. für Krebsforschung, **40**, *30*, 259 (1934).
7. E. MACOVSCHI, TR. RĂDULESCU, L. SCOLNIC, *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării muşchiului*, St. cercet. biochimie, **V**, *4*, 485—495 (1962).
8. L. JENDRASSIK, I. FAISZT, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion*, Annales Universitatis Scientiarum Budapestinensis de Rolando Eötvös nominatae, Sec. Biologica, *1*, 133 (1957).
9. P. BORDI, *Scissione e resintesi del fosfageno e cronassia*, Ateneo Parmense, **IV**, *6*, 755—773 (1932).
10. A. V. HILL, *Production and absorbtion of work by muscle*, Science, **131**, 897 (1960).

ASUPRA PREZENȚEI PENICILINELOR STRĂINE ÎN FERMENTAȚIA INDUSTRIALĂ CU DOUĂ TULPINI DE *PENICILLIUM CHRYSOGENUM*

DE

AL. SAUCIUC, MARGARETA BUDĂI, M. RUSAN și RODICA BOSTAN

La introducerea în producție a unei tulpini de *P. chrysegenum* cu productivitate ridicată — tulpina 194 — s-a constatat o scădere a randamentelor de purificare, atît la benzil-penicilină cît și la fenoximetil-penicilină.

Presupunerea inițială că prezența acizilor străini ar fi cauza randamentelor scăzute [1], [2], a fost eliminată, deoarece la dozarea acestora s-au găsit valori deosebit de mici.

Cercetările ulterioare au fost orientate în altă direcție, anume spre examinarea lichidelor de fermentație în privința conținutului eventual de peniciline străine.

Levitov [3], studiind metabolismul tulpinii 194, constată că acest producător, necesită cantități sporite de precursori, în comparație cu alte tulpini. În cazul mediilor de cultură cu precursori în cantitate normală (pentru alte tulpini), la tulpina 194 se formează pe lîngă penicilină dorită (benzil - sau fenoximetil-penicilină) și peniciline străine. Prin mărirea conținutului de precursori, aceste peniciline străine nu se mai formează. Autorul citat comunică date obținute în lucrări de laborator.

Lucrarea de față prezintă unele comportări ale acestei tulpini 194, în comparație cu tulpina 6018, pe scară industrială și în laborator.

MATERIALE ȘI METODE

Au fost supuse examinării lichide de fermentație obținute în condiții de laborator și în instalația industrială cu tulpinile 194 și 6018, pe diferite medii de cultură, concentrate de penicilină în diferite stadii de purificare industrială, precum și unele ape reziduale *).

Pentru separarea și identificarea penicilinelor s-a utilizat cromatografia pe hîrtie, cu identificare microbiologică, după următoarea tehnică :

Soluțiile analizate s-au diluat cu tampon fosfat pH 4,8 (20,8 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ și 4,523 g KH_2PO_4 la 500 ml apă) la 1000 u/ml. Pe fîșii de hîrtie Whatman nr. 1 de 5 mm lățime, îmbibate cu tamponul de mai sus și uscate, s-au aplicat cîte 1 și 3 ml din soluțiile

*) Fermentațiile de laborator și industriale, inclusiv stabilirea rețetelor de medii, au fost coordonate de ing. N. Hodorogea și ing. Giovana Agapie.

diluate. Ca martor s-a aplicat identic cîte 1 ml din soluţiile de benzilpenicilină sau fenoximetilpenicilină cu 1000 u/ml. După echilibrare 1/2 oră, fîşiile s-au irigat descendent sau ascendent cu eter etilic saturat cu apă şi s-au colorat cu Sudan III. Pentru identificarea pe cale microbiologică, fîşiile s-au aplicat pe tăvi cu mediu nutritiv agarizat, însămînţat cu Staphylococcus aureus 209 P. După o incubare de 16 ore la 37°C, tăvile s-au stropit cu o soluţie apoasă de 2.6-diclorfenolindofenol 0,1%, pentru colorarea zonelor de inhibiţie. Stropirea cu reactivi a bioautogramelor, aplicată de autori, este mai avantajoasă decît tehnica descrisă în literatură, anume turnarea reactivului în tavă şi îndepărtarea excesului prin spălare cu apă sau tamponare cu hîrtie de filtru. Diferitele peniciline se identificau din valorile R_G sau R_V (= R_f penicilină necunoscută/R_f penicilină G sau V), deoarece, în acord cu literatura, nu se obţineau valori constante ale mărimii R_f.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Într-o perioadă de 7 luni au fost examinate 46 de lichide de fermentaţie de laborator, 36 de lichide de fermentaţie industrială şi 27 de produse intermediare din diferite faze, atît de la benzil-penicilină, cît şi de la fenoximetilpenicilină.

În lichidele de fermentaţie industrială cu tulpina 6018 (fig. 1, *a*, *b*) cromatografic, pe lîngă zona penicilinei dorite (benzil- sau fenoximetil-penicilină), s-a mai găsit uneori şi zona heptilpenicilinei (penicilinei K), şi atunci în cantitate mică, abia sesizabilă, iar în lichidele de fermentaţie din laborator (fig. 1 *c*, *d*) s-a găsit pe lîngă penicilina dorită, o zonă pe linia de start, probabil o penicilină hidrofilă (*p*-hidroxibenzil-penicilină sau *p*-hidroxifenoximetil-penicilina) şi în cantitate mare.

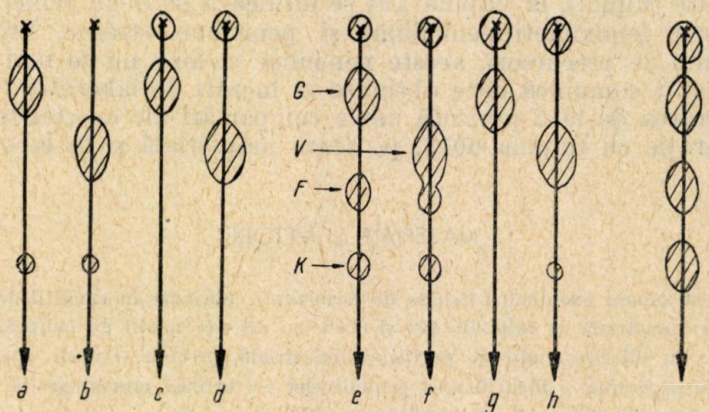


Fig. 1. — Rezultatul examinărilor cromatografice :
a, *c*, *e*, *g*, *i* — probe benzil-penicilină
b, *d*, *f*, *h* — probe fenoximetil-penicilină

În probele de laborator cu tulpina 194 (fig. 1 *g*, *h*) s-a găsit de asemenea o cantitate mare din penicilina hidrofilă de la start şi, foarte rar, în cazul cîtorva probe, de fenoximetil-penicilină, cantităţi mici de

heptilpenicilină. În lichidele de fermentație industrială cu tulpina 194 (fig. 1, *e*, *f*), pe lîngă penicilina dorită s-au găsit cantități apreciabile de pentenil-penicilină (penicilină F) și heptilpenicilină. În probele de fenoximetil-penicilină, uneori zona pentenil-penicilinei lipsea, probabil din cauza separării incomplete. Penicilina hidrofilă era în cantitate mai mică decît celelalte peniciline străine, sau chiar absentă la unele șarje. Aceste peniciline străine însoțesc benzil-penicilina sau fenoximetil-penicilina în toate fazele procesului tehnologic (fig. 1 *i*, ape mume de la cristalizare) și determină randamentele scăzute de purificare pe seama următoarelor fenomene :

— căderi de activitate anormale în cursul procesului, datorită stabilității reduse a penicilinelor străine ;

— activitate ridicată în apele mume de la cristalizare ;

— recuperare dificilă și incompletă prin intermediul dicilinei.

Prin mărirea conținutului de precursori și stabilirea unor noi rețete de medii, fermentațiile industriale, cu tulpina 194 au condus la reducerea apreciabilă a conținutului de heptil- și pentenil-penicilină și, implicit, la îmbunătățirea substanțială a randamentelor de purificare. În tabela nr. 1 se prezintă rezultatele comparative date de tulpinile 6018 și 194, pentru cea din urmă atît în condițiile vechi, normale de lucru, cît și în condițiile noi, îmbunătățite, lucrate în aceeași perioadă de timp.

Tabela nr. 1

Randamente de purificare medii, penicilină V

Tulpina	Media	Randament (%)
6018	a 3 șarje	52
194	a 11 șarje	30
194	a 3 șarje, rețetă nouă	41

Rezultate industriale ulterioare, cu rețeta nouă, au fost chiar mai bune decît cele din tabelă, totuși sub nivelul randamentelor obținute cu tulpina 6018. Perfecționarea în continuare a rețetelor de fermentație este îngreunată mult de faptul că în probele de laborator nu se pot încă reproduce condițiile din industrial, fapt ce a rezultat din cromatogramele prezentate ; conținutul de peniciline străine diferă între probele de laborator și cele industriale. Lucrări care sînt în curs vor soluționa și această problemă.

CONCLUZII

1. Mediile de cultură fermentate cu *Penicillium chrysogenum* 194 conțin peniciline străine în cantități mai mari decît cele fermentate cu tulpina 6018, fapt ce determină un randament mai scăzut la purificare.

2. Conţinutul de peniciline străine se poate reduce prin utilizarea unui mediu de fermentaţie potrivit.

3. Pentru aceeaşi tulpină şi acelaşi mediu, fermentaţiile industriale şi cele de laborator duc la conţinuturi diferite de peniciline străine.

Prezentată la redacţie
la 6 mai 1963

Fabrica de antibiotice
Iaşi

BIBLIOGRAFIE

1. T. BRUNER, Oster. Zt., **54**, *9*, 10 (1953) şi **54** *11/12*, 175 (1953).
2. S. C. PAN, D. PERLMAN, Anal. Chem., **26**, *9*, 1432 (1954) şi **27**, *1*, 65 (1955).
3. M. M. LEVITOR, L. M. LURIE G. F. Zavileiskaia, Antibiotiki, **6**, *12*, 1058 (1961)

STUDIU CITOCHIMIC ŞI CITOSPECTROFOTOMETRIC PE SERIA ALBĂ A ŞOBOLANILOR IRADIAŢI INTERN CU ^{32}P[1])

DE

GR. TURCU, C. DIMOFTACHE, P. WEXLER şi V. VASILESCU

În ultimul timp, iradierea internă a organismului a căpătat o pondere din ce în ce mai importantă şi aceasta se datorează atît extinderii ce se dă azi folosirii radioizotopilor în investigaţia sau terapia medicală, cît şi posibilităţii sporite pe care o au izotopii radioactivi de a ajunge în organism prin intermediul contaminării radioactive provenite din folosirea izotopilor în scopuri paşnice sau militare. Majoritatea lucrărilor de radiobiologie existente pînă în prezent s-au ocupat de efectele produse asupra organismului de către radiaţiile externe, în special de radiaţiile X şi gama.

Iradierea internă constituie un capitol nou de radiobiologie. Literatura existentă în acest domeniu ne arată că lucrările s-au limitat fie la a stabili pe diverse animale care este DL 50% şi DL 100% [1], fie la urmărirea curbei de scădere şi refacere leucocitară. Studii mai aprofundate de biochimie, de enzimologie, sînt foarte slab reprezentate. Mai bine reprezentate sînt studiile care urmăresc eliminarea prin complexare a substanţelor radioactive din organism [2—4]. Există însă o serie de izotopi care, intrînd în metabolismul general, sînt foarte greu sau aproape imposibil de eliminat prin metoda complexării [5]. În această categorie intră şi ^{32}P, care a constituit sursa folosită de noi pentru iradierea internă.

MATERIAL ŞI METODE

Lucrarea s-a efectuat pe şobolani tineri (3—4 luni), masculi, de rasa Wistar. Am început lucrarea pe 20 şobolani, din care, în urma determinării numărului de leucocite şi a formulei leucocitare, am eliminat 10 şi am reţinut 10 care prezentau valori cît mai apropiate (C.V. 10—15%).

S-au determinat următorii parametri:

1. Numărul de leucocite
2. Formula leucocitară
3. Procentul de granulocite în funcţie de nivelul activităţii fosfatazei alcaline. Metoda folosită a fost metoda citochimică a lui Gömöri, modificată de Leonard, Israels şi Wilkinson [6].

[1]) Lucrarea a fost comunicată în şedinţa din 25 aprilie 1963 a Uniunii Societăţilor Ştiinţelor Medicale, Secţia de biofizică a Societăţii de fiziologie.

Metoda ne-a permis diferenţierea granulocitelor în trei categorii, după nivelul activităţii fosfatazice :

— granulocite de gr. 0 — fără activitate fosfatazică ;

— granulocite de gr. I — cu activitate fosfatazică medie ;

— granulocite de gr. II — cu activitate fosfatazică maximă.

4. Curbele citospectrofotometrice ale nucleului limfocitar. Curbele s-au trasat cu ajutorul unui citospectrofotometru în spectrul vizibil, construit în laboratorul nostru [7].

După determinarea acestor parametri (în ziua zero) pe animale neiradiate, am împărţit animalele respective în două loturi, A şi B. Am administrat apoi prin injecţii intraperitoneale, atît lotului A cît şi lotului B, soluţie de ortofosfat de sodiu cu ^{32}P radioactiv. Cantitatea administrată a fost de 1 micro C/g de şobolan pentru lotul A şi 2 micro C/g de şobolan pentru lotul B. Această cantitate corespunde unei doze de 4,57 remi şi respectiv 9,14 remi/g de şobolan pentru toată durata medie efectivă de iradiere, care pentru ^{32}P este de aproximativ 20 de zile (19, 44 d) [8 —10][1]).

S-a urmărit apoi evoluţia parametrilor determinaţi în ziua zero, la următoarele intervale de timp după administrarea izotopului : 1, 3, 6, 9, 12, 15 şi 20 de zile. Ultima zi a fost astfel aleasă încît să corespundă cu durata medie efectivă de iradiere a ^{32}P. Recoltările s-au făcut întotdeauna începînd cu ora 8 dimineaţa.

REZULTATE

Rezultatele experimentale sînt prezentate grafic în următoarele 4 figuri :

— în figura 1 am reprezentat curba scăderii şi refacerii leucocitare în decursul iradierii ;

— în figura 2, am trasat variaţia limfocitelor şi neutrofilelor, în valori absolute, în acelaşi interval de timp ;

— în figura 3 am reprezentat variaţia procentului de granulocite cu un anumit grad de activitate al fosfatazei alcaline (gradul 0, I, II) ;

— în figura 4 am reprezentat abaterile pe orizontală (linii punctate) şi abaterile pe verticală (linii pline) ale curbelor citospectrofotometrice realizate pe limfocitul provenit de la animalele iradiate, abateri raportate la curba citospectrofotometrică realizată pe limfocitul animalelor martore (neiradiate). Normalul în figură este considerat ca fiind linia orizontală care începe de la punctul zero al sistemului de coordonate.

DISCUŢIA REZULTATELOR

Pentru a trece la discutarea rezultatelor experimentale, trebuie mai întîi să arătăm că între iradierea externă cu care s-au executat majoritatea lucrărilor de radiobiologie de pînă acum şi iradierea internă [11—13],

[1]) La calculul dozei nu s-a ţinut seama de tipul scheletal de repartizare a ^{32}P.

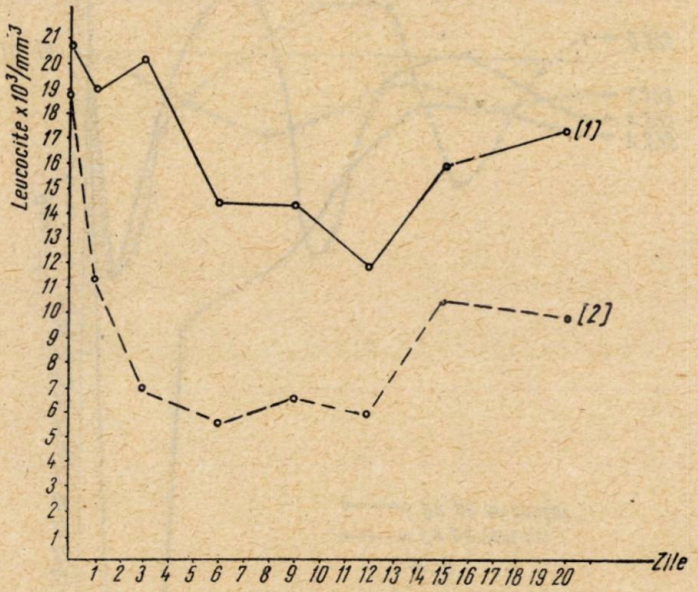


Fig. 1. — Variația numărului de leucocite în timp.
(1) — lotul A; (2) lotul B.

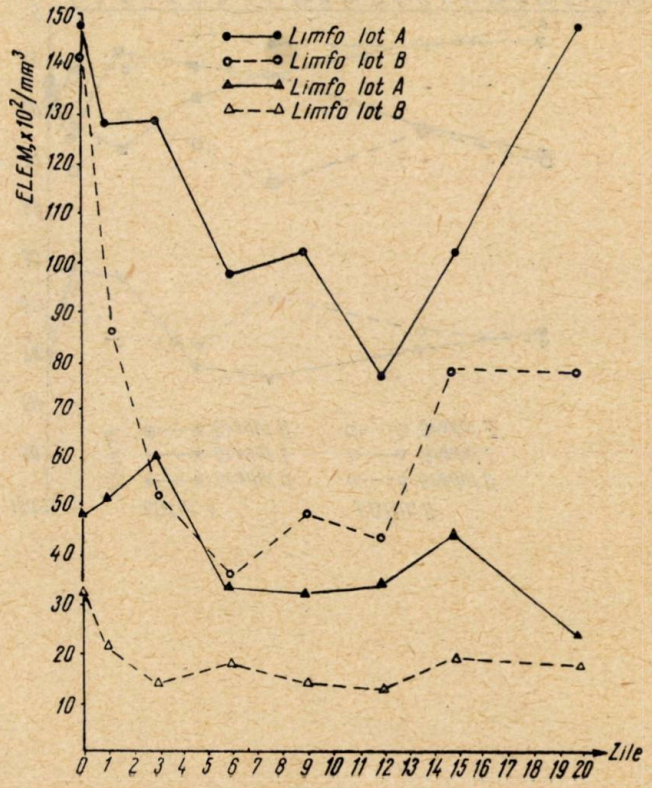


Fig. 2. — Variația valorii absolute a limfocitelor și neutrofilelor. →

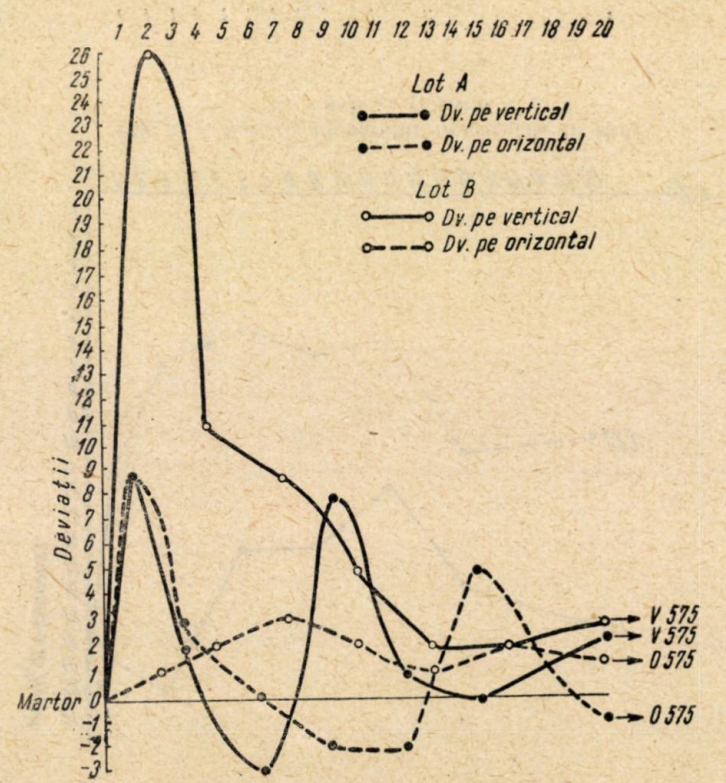


Fig. 3. — Variația procentului de granulocite cu un anumit grad de fosfatază alcalină leucocitară.

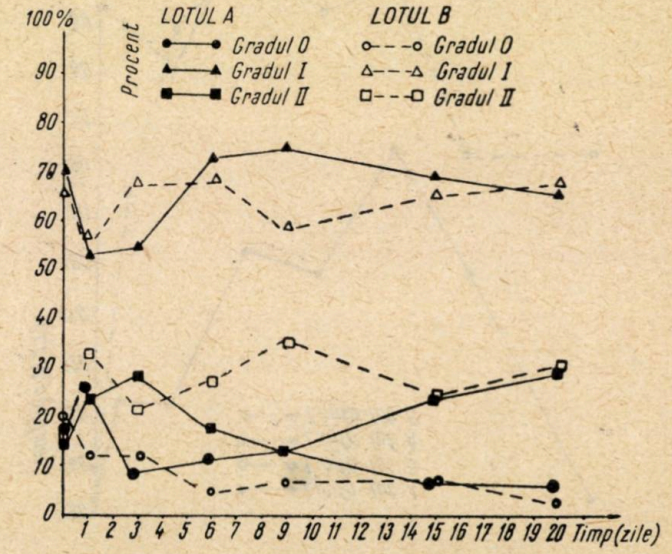


Fig. 4. — Variațiile citospectrofotometrice (la 575 mμ) ale nucleului limfocitar în decursul iradierii.

există deosebiri care ţin de o serie de factori. Ţinînd seama de aceştia, sursa noastră poate fi caracterizată astfel:

— cantitatea administrată a fost de 1 şi respectiv 2 microC/g;

— timpul de înjumătăţire fizic este de 14,7 zile, iar timpul de înjumătăţire biologic este de 257 de zile;

— energia radiaţiei emise este cuprinsă între 0 şi 1,7 MeV (în calcul se ia energia medie 0,69 MeV);

— puterea de ionizare este mare, întrucît la această energie parcursul radiaţiei se opreşte în cea mai mare parte la nivelul organismului (în plus 3% din ionizare se datorează radiaţiei secundare de frînare a electronilor);

— distribuţia ^{32}P în organism este de tip scheletal (după a 6-a zi de injectare ^{32}P se acumulează de preferinţă în oase).

Privind rezultatele noastre experimentale, după aceste precizări, se observă că există o deosebire evidentă între curba scăderii şi refacerii leucocitare a lotului A şi aceea a lotului B (fig. 1). Astfel, în cazul lotului A, în primele 3 zile de iradiere internă leucocitele din circulaţie nu scad semnificativ; scăderea lor semnificativă se remarcă în ziua a 6-a, pentru a atinge un maxim în ziua a 12-a, după care urmează o refacere leucocitară care în ziua a 20-a atinge 83% din valoarea iniţială. În cazul lotului B, scăderea numărului de leucocite este semnificativă din prima zi după administrarea sursei interne. Ea atinge o valoare maximă între zilele 3—12, după care începe refacerea leucocitară, care în ziua a 20-a atinge numai 51% din valoarea iniţială.

Aceste date ne arată că radiosensibilitatea organelor hematoformatoare, ilustrată prin diminuarea şi refacerea numărului de leucocite din periferie, este în concordanţă cu doza administrată.

În ceea ce priveşte variaţia procentului de limfocite şi neutrofile în decursul iradierii, ea nu este semnificativ diferenţiată între cele două loturi. Făcînd însă curba pentru valorile absolute, diferenţele ies bine în evidenţă (fig. 2). Am reprezentat valorile absolute nu atît pentru a releva limfopenia sau granulopenia, cît mai ales pentru a găsi o relaţie între repartiţia izotopului în organism şi variaţia celor două tipuri de celule [14], [15]. Graficul ne arată că în cazul lotului A, în primele 3 zile, cînd izotopul se găseşte diseminat relativ omogen în organism — şi înţelegem prin aceasta şi sistemul limfopoetic, — limfocitele scad, în timp ce granulocitele cresc datorită unei oarecari excitări a funcţiei medulare de către concentraţia slabă de ^{32}P din oase, acumulat în aceste prime trei zile. În a 6-a zi, cînd ^{32}P se află încorporat în cea mai mare cantitate în oase, granulocitele scad semnificativ şi se menţin scăzute chiar în a 20-a zi de iradiere. Această situaţie nu este similară pentru lotul B, la care cantitatea de izotop administrată a fost suficientă pentru a se acumula în oase în cantitate mare încă din prima zi, astfel încît granulocitele scad chiar din ziua întîi şi se menţin scăzute şi în ziua a 20-a, ceea ce corespunde cu depozitarea scheletală a ^{32}P.

În figura 3 sînt reprezentate variaţiile procentului de granulocite după gradul de activitate al fosfatazei alcaline pentru cele 2 loturi.

Se constată că procentul de granulocite din circulaţie cu activitate fosfatazică maximă (de gr. II) creşte în cursul iradierii. Această

creştere este cu atît mai mare cu cît doza administrată este mai mare. Procentul se menţine crescut şi în a 20-a zi de la administrarea izotopului. Aceste date arată că în timpul iradierii măduva eliberează în circulaţie granulocite ce se deosebesc de granulocitele eliberate în mod normal, printr-o activitate fosfatazică crescută. Acest lucru este întru totul diferit de situaţia pe care literatura o dă pentru celelalte ţesuturi, la care în decursul iradierii activitatea enzimatică celulară scade [14]. Deosebirea apare explicabilă dacă ţinem seama că, spre deosebire de celelalte ţesuturi, în care celulele coexistă cu iradierea *d'a capo al fine*, celulele din seria albă din circulaţie, în cazul nostru granulocitele, sînt schimbate periodic cu granulocite nou formate în măduvă. Determinări ale duratei de viaţă leucocitară, cu diisopropilfluorofosfonat de sodiu marcat cu ^{32}P, au arătat că în timp ce leucocitele trăiesc la şobolanul normal 3 zile în circulaţie, la şobolanul iradiat ele trăiesc numai 3 ore. Faptul cel mai deosebit în lucrarea noastră este acela că deşi s-a administrat ^{32}P ca ortofosfat, care atacă în primul rînd fosfatazele — deoarece el constituie substratul specific pentru aceste enzime — totuşi procentul de granulocite cu activitate fosfatazică mărită a crescut în timpul iradierii. Date din literatură ne arată că această situaţie este similară celei existente în afecţiunile în care activitatea axei hipofizo-suprarenale este crescută [6]. Creşterea ACTH-ului sau hormonilor corticoizi constituie factori responsabili de creştere a fosfatazei alcaline leucocitare. Aceste date, corelate cu alte date fiziopatologice, au determinat pe mulţi radiobiologi să privească iradierea ca un agent stressant şi să încadreze boala de iradiere în sindromul general de adaptare [12].

În figura 4 sînt reprezentate abaterile de la normal ale curbelor citospectrofometrice date de nucleul limfocitului ce apare în circulaţie în timpul iradierii. Linia continuă reprezintă abaterile pe verticală la lungimea de undă de 575 mμ, iar linia punctată reprezintă abaterile pe orizontală la aceeaşi lungime de undă. Abaterile pe verticală sînt date de modificarea capacităţii tinctoriale a materialului din nucleu, iar abaterile pe orizontală sînt date de modificări calitative din nucleu. Graficul nu ne-a permis să stabilim o corelaţie între doza de iradiere şi modificările apărute în nucleu; aceasta ne arată că limfocitele apărute în circulaţie în timpul iradierii au un material nuclear foarte heterogen. Studiul curbelor relevă o tendinţă de absorbţie spre lungimi de undă mai mari — de aceea în grafic am prezentat situaţia curbelor la 575 mμ, şi nu la 460 şi 530 mμ unde de asemenea avem maxime de absorbţie. Tendinţa de absorbţie spre lungimi de undă mai mari trădează tinereţea limfocitelor din circulaţie la animalele iradiate. Curbele ne arată deci că limfocitele existente în circulaţie în timpul iradierii au nucleul deosebit de cel al limfocitelor existente în mod normal.

CONCLUZII

1. Scăderea şi refacerea numărului de leucocite în sîngele periferic al şobolanului este funcţie de doza de ^{32}P administrată.

2. Doza de 4,57 remi/g corespunzătoare la 1 microC/g de şobolan produce în primele 3 zile o uşoară excitare a măduvei hematopoetice, fapt

relevat de creşterea valorii absolute a granulocitelor în această perioadă. Doza dublă inhibă din prima zi activitatea hematopoetică.

3. Procentul de granulocite cu un nivel crescut de fosfatază alcalină este cu atît mai ridicat, cu cît doza administrată este mai mare.

4. Nucleul limfocitelor existente în circulaţie în timpul iradierii interne, se deosebeşte de nucleul limfocitelor animalelor martor, prin capacitatea tinctorială şi prin lungimea de undă la care are maximum de absorbţie.

Prezentată la redacţie
la 17 mai 1963

Catedra de biofizică a Institutului de medicină şi farmacie, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. D. I. ZAKUTINSKI, D. I. PARFENOV, L. N. SELIVANOV, *Spravocinik po toksicologii radioaktivnîh izotopov*, Medghiz, Moskova, 1962.
2. A. A. GORODETKI, *Vîvedenie iz organisma nekotorîh radioactivnîh veşcestv*, Medghiz, Kiev, 1959.
3. D. SEMENOV, I. TREGUBENKO, Nature, **193**, 391 (1962).
4. A. CATCH, Nature, **191** 715 (1961).
5. D. I. SEMENOV, Analele romîno-sovietice, seria chimie, *1*, 103 (1960).
6. C. T. NICOLAU, S. NICOARĂ, Med. internă, *10*, 1173 (1962).
7. A. CIURES, V. VASILESCU , MARIA CONSTANTINOV, Fiziologia, *6*, 543 (1962).
8. M. ONCESCU, *Detectarea şi măsurarea radiaţiilor nucleare, Note de curs*, Bucureşti, 1960.
9. H. SCHWIEGH, F. TURBA, *Kunstliche radioaktive isotope in physiologie, diagnostik und therapie*, vol. II, p. 838, Springer-Verlag, 1961.
10. J. VENNART, MARGARET MINSKI, Brit. J. Radiol., **35**, *414*, 372 (1962).
11. A. A. GORODETKI, B. R. KIRICINSKI, N. F. LIPCAN, *Probleme de radiobiologie*, Kiev, 1961 (traducere C.D.M.).
12. Z. M. BACQ, P. ALEXANDER, *Principes de radiobiologie*, Masson, Paris, 1955.
13. L. O. IACOBSON, *Radiation biology*, vol. II, McGraw — Hill Comp., New York, 1956.
14. P. N. KISELEV, Vestnik rentghen. i radiol., *1*, 3 (1955).
15. A. M. PLESCOV, Klinicesk. med., *2*, 13 (1955).

RECENZII

EUGENIA SORU, *Biochimie medicală*, vol. II, Edit. medicală, Bucureşti, 1963.

De curînd a apărut în Editura medicală volumul II al tratatului de Biochimie medicală de Eugenia Soru.

Lucrarea, editată în bune condiţii, cuprinde în cele peste 700 de pagini ale sale numeroasele aspecte legate de biochimia dinamică. Faţă de tratatul aceleiaşi autoare, apărut în anul 1953, actuala lucrare, pe lîngă faptul că ea cuprinde ultimile noutăţi în domeniul biochimiei, prezintă în plus calitatea de a fi mult mai dezvoltată.

În prima parte, după o introducere cuprinzînd generalităţi asupra studiului metabolismelor intermediare, se face o concisă prezentare a metodelor de studiu ale acestor metabolisme.

Urmează un capitol despre biochimia sucurilor digestive, cuprinzînd saliva, sucul gastric, sucul pancreatic, bila. sucul intestinal şi fecalele.

Capitolul următor, cel mai dezvoltat, este dedicat metabolismelor intermediare. Aici sînt tratate fotosinteza şi metabolismul glucidelor în organismul animal, digestia, absorbţia şi metabolismul intermediar cuprinzînd glicogeneza hepatică, gliconeogeneza, catabolismul anaerob şi aerob, glicemia şi mecanismele ei de reglare, precum şi dereglările patologice ale metabolismului glucidic. În cadrul metabolismului lipidelor, sînt prezentate metabolismul grăsimilor neutre, steridelor şi carotenoidelor, precum şi dereglările metabolismului lipidic.

În problema metabolismului proteinelor, după digestie şi absorbţie se tratează catabolismul aminoacizilor, biosinteza acestora, metabolismul specific al diverşilor aminoacizi. metabolismul nucleoproteidelor şi al hemoglobinei. Capitolul se încheie cu metabolismul mineral, urmat de o prezentare a interrelaţiilor şi a reglării metabolice.

În capitolul „Metabolismele intermediare" remarcăm bogăţia şi punerea la zi a materialului prezentat, precum şi faptul că metabolismul este privit ca un tot unitar, cu interrelaţiile respective. Urmărirea materialului este facilitată de numeroase scheme sugestive.

Capitolul următor este închinat biochimiei umorilor. Conform importanţei sale, sîngele se bucură de o amplă expunere, cuprinzînd coagularea, funcţiile sîngelui — în cadrul cărora se prezintă şi mecanismele de reglare ale izotoniei şi izoioniei — compoziţia chimică şi elementele figurate. Apoi autoarea face o scurtă privire asupra lichidelor interstiţiale : limfa, lichidul sinovial, transsudatele şi exsudatele, precum şi lichidul cefalorahidian.

Urmează biochimia ţesuturilor şi organelor în care, după prezentarea celulei — formaţiuni, pătură limitantă, permeabilitate — se trece la studiul metabolismului ţesuturilor nervos, muscular şi de susţinere—ţesutul conjunctiv, pielea, ţesutul adipos, cartilaginos, osos şi dinţii.

În cadrul biochimiei organelor, se tratează despre ficat şi rinichi — biochimismul, funcţiile şi metodele de explorare ale acestor funcţii. În încheiere sînt prezentate şi organele de simţ.

Între acest capitol şi cel dedicat energeticii substanţei vii, se intercalează biochimia secreţiilor neîncadrate între sucurile digestive, şi anume a laptelui, lichidului lacrimal şi a spermei.

Volumul se încheie cu un capitol asupra energeticii substanţei vii în care, după o introducere asupra energiei şi termodinamicii, se arată importanţa principiilor termodinamice în biologie şi se prezintă valoarea calorică a alimentelor şi metabolismul energetic.

O vastă bibliografie, cuprinzînd în jur de 500 indicaţii, pusă la punct pînă în anul 1962, încheie această valoroasă lucrare, căreia nu am avea să-i reproşăm decît lipsa unui index de subiecte, atît de necesar unei cărţi ştiinţifice. Acest fapt îngreunează folosirea lucrării şi împiedică valorificarea deplină a materialului cuprins în ea.

În ansamblu însă, „Biochimia medicală" îndeplineşte cerinţele unui tratat modern, fiind pus la punct cu ultimile cuceriri ale ştiinţei, privind atît latura normală, cît şi cea patologică a biochimiei şi dînd indicaţii aproape în cadrul fiecărei probleme asupra celor mai noi metode de cercetare.

Prin aceste calităţi, tratatul se adresează biochimiştilor şi medicilor care lucrează în toate domeniile, inclusiv cercetarea ştiinţifică. Apariţia lui vine să completeze în mod fericit seria de lucrări apărute în ţara noastră în domeniul biochimiei.

D. Moţel-Grigoraş

Dr. HEINZ LANGENDORF, Säure-Basen-Gleichgewicht und chronische acidogene und alkalogene Ernährung (*Echilibrul acido-bazic şi alimentaţia cronică acidogenă şi alcalogenă*), Supplementum 2 al revistei „Zeitschrift für Ernährwissenschaft", Darmstadt 1963, Edit. Dr. Dietrich Steinkopff.

Relaţiile dintre conţinutul alimentelor în acizi şi baze şi echilibrul acido-bazic al organismului, care trebuie respectate la alcătuirea meniului pentru omul sănătos şi bolnav, au format obiectul multor cercetări, speculaţii şi discuţii contradictorii. Se întîlnesc astfel o serie de concepţii, începînd cu acelea după care compoziţia alimentelor n-ar avea nici o influenţă asupra echilibrului acido-bazic, şi pînă la acelea după care conţinutul în acizi şi baze ar fi criteriul principal în folosirea sau respingerea unui aliment într-o anumită formă de alimentaţie dietetică.

Problema aceasta nu a putut fi rezolvată pînă în prezent într-un mod satisfăcător, deoarece experienţele efectuate pe om şi animal au fost de obicei de prea scurtă durată pentru a permite organismului instalarea de noi echilibre corespunzătoare noilor condiţii de alimentaţie.

În lucrarea de faţă sînt publicate rezultatele unor cercetări de durată mai lungă, efectuate pe şobolani, cu privirea la influenţa cronică a unei alimentaţii acidogene şi alcalogene asupra echilibrului acido-bazic şi asupra altor funcţii ale organismului. După o prezentare succintă a teoriei lui Brönstedt cu privire la acizi şi baze şi după o privire de ansamblu asupra fiziologiei echilibrului acido-bazic, autorul trece la analiza factorilor naturali acidogeni şi alcalogeni din alimente şi discută mecanismul lor de acţiune asupra echilibrului acido-bazic.

În partea experimentală, autorul arată mai întîi în mod amănunţit, condiţiile de creştere ale animalelor de experienţă, compoziţia hranei lor, precum şi construcţia cuştilor special amenajate, care permit realizarea unui control riguros atît al cantităţii de hrană consumate, cît şi al cantităţii produşilor eliminaţi (fecale, urină). În continuare, sînt redate observaţiile făcute cu privire la dezvoltarea animalelor şi la mortalitatea lor şi la cauzele acesteia. Se dau şi se discută de asemenea rezultatele analizelor de sînge şi urină, precum şi cele ale cercetărilor histologice şi fiziologice. Animalele cărora împreună cu hrana, li s-au administrat timp de 8

respectiv 32 de luni, şi anumite cantităţi de clorură de amoniu (hrană acidogenă) sau de bicarbonat de sodiu (hrană alcalogenă), prezentau în concentraţia electroliţilor din ser doar variaţii foarte mici, dar ele posedau în schimb simptome care indicau o influenţare a metabolismului glucidic, lipidic şi al colesterolului. Aceste modificări ale metabolismului sînt considerate drept consecinţe ale deplasării echilibrului acido-bazic şi altor echilibre ale electroliţilor. Urmarea cea mai gravă a deplasării echilibrului acido-bazic, indiferent de sensul în care are loc, este scurtarea semnificativă a duratei de viaţă.

Autorul ajunge la concluzia că, cu toate că formele de alimentaţie moderat unilaterale nu reprezintă nici un pericol pentru om, totuşi să fie evitate formele de alimentaţie extrem de unilaterale şi de uniforme atît ca alimentaţie de lungă durată, cît şi ca alimentaţie dietetică mai îndelungată, deoarece aceasta ar putea duce în anumite împrejurări favorabile la o deplasare critică a echilibrului acido-bazic.

Articolul scris într-un stil clar, este însoţit de 9 scheme şi figuri, cuprinde şi un material experimental bogat şi centralizat în 15 tabele, are 76 de pagini şi 440 de trimiteri bibliografice. Un cuprins în ordinea capitolelor şi un index alfabetic uşurează mult folosirea lucrării.

H. D. Schell

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

1796. PORSCHE TH., *Determinarea acidului lactic cu lactatdehidrogenază preparată din drojdie*, Studii şi cercet., chim., Timişoara, 1962, **IX**, *3 — 4*, 309 — 320.

Pentru dozarea enzimatică a acidului lactic din ser sau sînge s-a folosit o lactatdehidrogenază cu o puritate de 6 — 7% în extractul enzimatic. Purificarea enzimei s-a realizat prin : 1) uscarea drojdiei de brutar ; 2) autoliza drojdiei uscate ; 3) tratarea suspensiei de drojdie obţinută prin autoliză, cu hidroxid de aluminiu ; 4) încălzirea suspensiei şi adăugarea de DL-lactat-Na ; 5) absorbţia enzimei pe gel de fosfat de Ca ; 6) eluţia enzimei de pe gelul de fosfat de Ca : 7) precipitarea fracţionată cu sulfat de amoniu (SA) la pH 7,2 (saturaţia = SA = 0,39) ; 8) precipitarea fracţionată cu SA la pH 4,8 (saturaţia = SA = 0,45). Dozarea propriu-zisă constă în tratarea extractului (deproteinizat şi neutralizat) cu enzima purificată în prezenţa fericianurei de K (ca acceptor de H) şi citirea decolorării la un spectrofotometru la 420 mm, sau la un fotometru F CT 1 (IOR Bucureşti), sau Pulfrich (C. Zeiss) cu filtrul S 42.

N. Moldoveanu

1797. IALOMIŢEANU M., ATHANASIU P. şi ANDREESCU M., *Metode noi de investigare a funcţiilor hepatice în hepatita epidemică. I. O nouă probă a funcţiilor hepatice prin explorarea metabolismului triptofanului în hepatita epidemică*, Studii şi cercet., inframicrobiol., 1963, **XIV**, *3*, 349—354.

S-a dozat 5-hidroxiindolacetatul la 60 de bolnavi cu hepatită epidemică, 5 cu hepatită cronică şi 5 cu alte afecţiuni hepatice, comparativ cu un lot de 20 de persoane sănătoase. Explorarea metabolismului triptofanului reprezintă o probă concludentă în diagnosticul pozitiv şi diferenţial al hepatitelor epidemice, putîndu-se urmări în acelaşi timp şi evoluţia bolii.

D. Tănăsescu

1798. IOACHIMESCU E. şi PLATON F., *Contribuţii la studiul dozării alcaloizilor din tinctura de belladonna*, Farmacia, 1962, *4*, 247 — 250.

Se face un studiu critic al metodelor volumetrice, recomandate de diferite farmacopei pentru dozarea alcaloizilor din tinctura de belladonna şi se constată că folosind concentrarea sub presiune redusă se pot obţine rezultate reproductibile.

S. Vasu

1799. CIOGOLEA GH., MORAIT GH., BALOESCU C., TEODORESCU N., CREANGĂ S., TUDOR M., PETRONIU L. şi IONESCU G., *Dozarea complexometrică a veronalului*, Farmacia, 1962, *5*, 257 — 261.

Autorii stabilesc o metodă complexometrică pentru dozarea veronalului prin precipitare cu un exces de $CuSO_4$ amoniacal şi piridină. Rezultă un complex greu solubil cu formula $Cu_2(C_5H_5N)_4$(barbit.)$_2$. După cîteva minute de repaus, se filtrează şi în filtrat se titrează excesul de Cu^{2+} cu complexon III 0,05 m, în prezenţă de murexid ca indicator. Metoda este aplicabilă şi altor derivaţi barbiturici şi dă rezultate bune.

S. Vasu

1800. CONSTANTINESCU E., CIULEI I. şi STĂNESCU M., *Identificarea, dozarea şi extragerea alantoinei din planta* Echium vulgare *L.*, Farmacia, 1962 *5*, 277 — 281.

S-a izolat din partea aeriană a plantei *Echium vulgare* L. alantoina pură cu p. t. 239° — 240°. Folosind metoda fotometrică (Cazmarek şi Walicka), autorii constată că alantoina în stadiul de înflorire a plantei se găseşte astfel repartizată : rădăcina 1,18 g %, tulpina 1,07 g %, frunza 1,28 g % şi floarea 1,42 g %.

S. Vasu

1801. ZOTTA V., SERPER A. şi POPESCU M., *Medicamente inhibitoare ale monoaminoxidazei*, Farmacia, 1962, *12*, 705 — 716.

Referat general cu 10 indicaţii bibliografice.

S. Vasu

1802. APREOTESEI C. şi TEODOSIU M, *Vitaminele B_{15} — acţiune biochimică şi terapeutică*, Farmacia, 1963, *1*, 3 — 12.

Referat general cu 16 indicaţii bibliografice.

S. Vasu

1803. HOCIUG J., *Radioizotopii întrebuințați ca medicamente*, Farmacia, 1963, *1*, 13 — 26.

Referat general cu 20 de indicații bibliografice.

S. Vasu

1804. SĂLĂGEANU N., *Cercetări cu ^{14}C asupra mecanismului fotosintezei*, Natura, seria biol., 1962, **XIV**, *4*, 3 — 15.

Lucrarea cu 30 de indicații bibliografice prezintă progresele făcute în investigarea mecanismului fotosintezei cu ajutorul metodei cromatografice și prin localizarea ^{14}C în moleculele substanțelor organice formate în frunze la lumină și în atmosferă de $^{14}CO_2$. Se arată că ipoteza după care în procesul de fotosinteză s-ar forma aldehidă formică nu a putut fi verificată, $^{14}CO_2$ fiind asimilat sub formă de grupare carboxilică — $^{14}COOH$. Sînt întărite ipotezele după care fotosinteza este un proces ciclic, invers respirației. Se arată de asemenea rezultatele cercetărilor după care, pe lîngă acizi organici și glucide, în fotosinteză se mai produc și aminoacizi.

N. Moldoveanu

1805. PICOȘ A. C., *Rolul enzimelor în metabolismul corpurilor vii*. Natura, seria biol., 1962, **XIV**, *5*, 30 — 38.

Referat general cu 10 indicații bibliografice.

N. Moldoveanu

1806. MUREA I., PINTILIE S. și STERESCU M., *Dozarea progesteronei și a propionatului de testosteron, în amestec, din soluții uleioase*, Rev. chimie, 1962, **XIII**, *3*, 171.

După separare prin cromatografie pe hîrtie, se developează descendent, folosind stratul superior al unui amestec de benzină-alcool metilic-apă (50 :40 :10 în volume). După uscare se colorează prin pulverizare cu soluție de 2,4-dinitrofenilhidrazină, se eluează spoturile în alcool etilic 95° și după centrifugare se citește la spectrofotometru, la 2400 — 2420 Å. în cuva de 1 cm, față de o probă martor obținută prin tratarea unei bucăți de hîrtie, de aceeași suprafață, în același mod.

D. Moțet-Grigoraș

1807. BALABAN A. T., *Descifrarea codului genetic care dirijează sinteza proteinelor*, Rev. chimie, 1962, **XIII**, *11*, 679 — 681.

Se prezintă pe scurt cele mai noi date ale științei obținute în domeniul structurii acizilor nucleici, al descifrării codului genetic și al sintezei proteinelor.

D. Moțet-Grigoraș

1808. BARAN TR., *Utilizarea ^{24}Na și ^{42}K în medicina clinică și experimentală*, Rev. medico-chirurgic., Iași, 1962, **LXVI**, *1*, 7 — 16.

Referat general cu 19 indicații bibliografice.

A. Batcu

1809. FAIGHELIS C., *Transaminazele, date biochimice și aplicații practice*, Rev. medico-chirurgic., Iași, 1962, **LXVI**, *2*, 285 — 290.

Referat general cu 11 indicații bibliografice.

A. Batcu

1810. DUCA E., *Anticorpi fluorescenți. Perspective și limite de aplicare*, Rev. medico-chirurgic., Iași, 1962, **LXVI**, *2*, 571 — 582.

Referat general cu 28 de indicații bibliografice.

A. Batcu

1811. MODY E., SZABÓ ST., SZÉKELY I. și DÓCZY P., *Cercetări experimentale în domeniul aterosclerozei. II. Rezultatele obținute cu o metodă personală de cercetare a proteinelor miocardice în ateroscleroza experimentală*, Rev. med., Tg. Mureș, 1962, *3*, 275 — 278.

Metoda propusă constă în omogenizarea miocardului în soluție tampon medinal-veronal (pH 8,6) în proporție 1 :10, centrifugare și concentrarea supernatantului, folosind ca ultrafiltru sacul de colodiu, pînă la 6—8% proteine. Electroforeza pe hîrtie a extractului miocardic astfel obținut conduce la 5 fracțiuni proteice. În cazul iepurilor cărora li s-a administrat 5 luni de zile colesterol, autorii constată modificări caracteristice în proteinele miocardice, asemănătoare celor din miocardoza Wuhrmann.

S. Vasu

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

1812. KISS A., EPERJESSY A., ADAM S. și CZÉGENI J., *Examinări comparative în legătură cu compoziția chimică a lipoproteidelor cerebrale la oameni, iepuri, bovine și păsări*, Rev. med., Tg. Mureș, 1962, *3*, 313 — 315.

Autorii fac un studiu comparativ privind compoziția chimică a lipoproteidelor cerebrale, arătînd că acestea diferă mult între ele în funcție de originea lor. Se constată deosebiri

cantitative numerice între aminoacizii lipoproteidelor ; în cele umane s-au evidenţiat 16 aminoacizi, în cele bovine 12, iar în cele de la iepuri şi păsări 10 aminoacizi. Există şi deosebiri privind conţinutul lipoproteidelor în colesterol, fosfor şi azot.

S. Vasu

III. BIOCHIMIA GLUCIDELOR

IV. BIOCHIMIA LIPIDELOR

V. ENZIME

1813. VOICU I., *Influenţa acidului boric asupra fermentaţiei butirice şi a bacteriilor respective în mediu sintetic*, Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1963, **XV** *2*, 251—270.

Adăugarea în mediul sintetic a acidului boric—ca tampon de borat—în concentraţie de 0,68 g % şi 0,34 g % a ameliorat mersul fermentaţiei butirice, producînd o creştere a cantităţii de acizi volatili (în special acid butiric) şi a celei de acizi ficşi. Rezultatele obţinute permit formularea unor consideraţii teoretice asupra căilor de formare a principalilor metaboliţi în fermentaţia butirică.

H. Filipescu

1814. CLOPOTARU M., SARAGEA M. şi MĂRCULESCU N., *Activitatea enzimatică a ficatului. Nota III. Studiul activităţii dehidrazice a ficatului în diverse agresiuni.* Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *2*, 307 — 312.

Studiind pe şobolani prin determinarea activităţii dehidrazelor ciclului Krebs, corelaţia dintre natura agresiunii şi etapa obţinerii energiei pe calea metabolică comună, autorii constată în toate felurile de agresiune (intoxicaţia acută cu tetraclorură de carbon, ischemie, ocluzie intestinală înaltă şi joasă) o inhibiţie a activităţii dehidrazelor studiate şi un paralelism între gradul inhibiţiei şi severitatea agresiunii. Cea mai netă inhibiţie se constată în activitatea malicodehidrogenazei.

H.D.Schell

VI. VITAMINE. HORMONI, ALŢI COMPUŞI BIOACTIVI

1815. GROZA P., CORNEANU M. şi BUŞNEAG C., *Mecanismul de acţiune al aldosteronului asupra secreţiei stomacului.* Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *2*, 223 — 226.

Cercetări efectuate pe cîini cu mic stomac Pavlov au arătat că aldosteronul inhibă net secreţia sucului gastric. Cantitatea sodiului plasmatic variază invers faţă de a celui din sucul gastric, în timp ce cantitatea potasiului plasmatic variază în acelaşi sens.

H. D. Schell

1816. KELEMEN L., HADNAGY CS., MÓZES M., SZILÁGYI D., LÁZLÓ L., PALENCSÁR A., ZSEMLYEI M. şi RAVASZ I., *Date experimentale în legătură cu valoarea terapeutică a vitaminei E în hepatita epidemică*, Rev. med., Tg. Mureş 1962, *3*, 329 — 332.

Autorii urmăresc pe un număr de 74 de bolnavi, acţiunea exercitată de vit. E asupra toleranţei glucidice, stabilind prin calcul statistic, că efectul obţinut este fără semnificaţie. Totuşi în cursul celei de a-doua hiperglicemii, toleranţa s-a ameliorat în 45% din cazuri, ceea ce duce la concluzia că la o parte din bolnavii de hepatită epidemică vitamina E influenţează favorabil metabolismul hidraţilor de carbon.

S. Vasu

VII. BIOCHIMIA MICROBILOR. VIRUSURI. BACTERIOFAGI. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

1817. CÎRSTEA şi SUHACIU GH., *Asupra eficacităţii diferitelor căi de administrare a antiserului în sensibilizarea pasivă a cobaiului*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *2*, 245—252.

Experienţe efectuate pe cobai sensibilizaţi pasiv cu ser antiovalbumină, preparat pe iepure, au arătat că numai în limite foarte restrînse, situate în imediata vecinătate a dozei de antiser ce sensibilizează letal 50% din animale, poate fi stabilită o diferenţă statistic semnificativă în intensitatea sensibilizării provocate de două doze de antiser ce diferă prin raţia 1 :2. Folosind aceste doze de antiser, sensibilizarea provocată prin administrarea intravenoasă sau intracardiacă este mai intensă decît cea produsă pe cale intraperitoneală, indiferent dacă declanşarea şocului este făcută după 24 sau 48 de ore de la injectare.

H. D. Schell

1818. PORTOCALĂ R. şi SAMUEL I., *Acţiunea unor agenţi fizici şi chimici asupra infectivităţii acizilor nucleici izolaţi din virusuri. II. Influenţa căldurii asupra infectivităţii acidului ribonucleic extras din virusul M. M.*, Studii şi cercet. inframicrobiol., 1963, **XIV**, *3*, 269 — 275.

ARN supus încălzirii la 60 şi 75° C şi răcit apoi lent (la temperatura camerei) îşi pierde (după 25 de minute) şi îşi recapătă infectivitatea (după 35 minute) în funcţie de timp. Răcirea bruscă (la 0°) a ARN încălzit la 75° îi prezervă infectivitatea într-un procent mai ridicat decît în cazul răcirii lente. Se sugerează unele ipoteze explicative ale fenomenului studiat.

D. Tănăsescu

1819. PORTOCALĂ R., SAMUEL I. şi DONA G., *Studiul acidului desoxiribonucleic, infectant extras din adenovirusul de tip 3*, Studii şi cercet. inframicrobiol., 1963, **XIV**, *3*, 277—281.

ADN extras este infecţios provocînd apariţia efectului citopatic caracteristic după însămînţarea sa pe culturi celulare de embrion uman. Această acţiune este inhibată de desoxiribonuclează. Virusul sintetizat în celulă sub acţiunea ADN izolat, este un adenovirus de tip 3.

D. Tănăsescu

1820. ANGHEL C. şi DRĂGHICI C., *Contribuţii la studiul hidrolizei hipuratului de sodiu de către streptococ*, Microbiol., parazitol., 1963, **VIII**, *3*, 271 — 275.

Se descrie o metodă nouă de identificare a acidului benzoic după o extracţie în prealabil cu amestecul eter etilic — eter de petrol 1 :3. Se propune şi un mediu de cultură bulion sau hipurat care favorizează dezvoltarea streptococilor.

D. Tănăsescu

VIII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

1821. FABIAN-GALAN G., *Despre mersul fotosintezei în decursul zilei la frunzele aeriene şi despre substanţele organice acumulate în ele*, Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1963, **XV**, *3*, 341 — 359.

Experienţele efectuate cu lucernă, bumbac, trifoi şi spanac au arătat că mersul fotosintezei în cursul zilei este determinat de lungimea zilei şi nu de faza de vegetaţie în care se află plantele. În zilele lungi şi senine, în condiţiile unei umidităţi optime, intensitatea fotosintezei prezintă două maxime, separate unul de celălalt printr-o depresiune pronunţată, iar pe măsură ce se scurtează durata zilei, intensitatea fotosintezei are un caracter din ce în ce mai pronunţat unimaximal. S-a constatat un mers invers între acumularea amidonului şi intensitatea fotosintezei şi un paralelism direct între aceasta din urmă şi variaţiile cantitative ale acizilor tartric, citric şi glicerofosforic.

H. Filipescu

1822. FABIAN I., *Despre potenţialul oxidoreducător la algele filamentoase şi la plantele acvatice superioare*, Studii şi cercet. biol., biol. veg., 1963, **XV**, *3*, 361 — 385.

Experienţele întreprinse pe filamente de *Spirogyra sp.*, frunze de *Vallisneria spiralis* şi ramuri de *Holodea canadensis* au arătat că iluminarea, asociată cu o evacuare bună a oxigenului din ţesuturi provoacă o mişcare a potenţialului redox, dar o creştere continuă şi îndelungată cînd este asociată cu o evacuare defectuoasă a oxigenului. Trecerea probelor vegetale de la lumină la întuneric duce, în condiţii aerobe, la inversarea sensului de modificare a potenţialului. În condiţii de anaerobioză îndelungată, cînd sînt posibile denaturări metabolice, mersul potenţialului din timpul iluminării depinde de durata perioadei de întuneric premergătoare. Oxigenul fotosintetic, acumulat în mediu şi ţesut prin izolare ermetică, modifică mersul potenţialului redox numai cînd tensiunea sa este relativ mare. În condiţii de anaerobioză şi întuneric, potenţialul redox se micşorează rapid.

H. Filipescu

1823. MUREȘANU L. P. CZEISLER G. și LAZĂR M., *Cercetări chimice și biochimice asupra produselor vegetale. III. Contribuții la cunoașterea conținutului în triptofan al boabelor de porumb, supus acțiunii diferitelor tratamente*, Studii și cercet.chim., Timișoara, 1962, **IX**, *3 — 4*, 353 — 359.

La soiurile de porumb și hibrizii analizați se constată o variație a conținutului în proteină brută (între 8,52 și 10,12 %), un oarecare paralelism al conținutului ei cu al zeinei și o proporționalitate inversă în ceea ce privește conținutul în glutelină și triptofan. Administrarea de îngrășăminte determină o creștere a proteinei brute și a conținutului de zeină la toți hibrizii, cît și la martor, și o scădere concomitentă a conținutului de glutelină și triptofan. Cultivarea porumbului în asociație cu leguminoase duce la o ușoară creștere a conținutului de proteină brută, o creștere a conținutului de triptofan în anul I și II, și o scădere în anul III de experimentare și o creștere a conținutului de lipide și amidon. Autorii consideră că determinarea conținutului în triptofan poate constitui (între alte criterii) o caracteristică valoroasă pentru aprecierea calitativă a boabelor de porumb.

N. Moldoveanu

1824. CONTZ O., GHEORGHIU M. și IURACEC AL., *Studiul cromatografic al migrării alcaloizilor din speciile* Aconitum callibotryon Rehb., Aconitum romanicum Wol. *și* Aconitum tauricum Wulf, Farmacia, 1962, *7*, 403 — 407.

Studiul cromatografic al migrării alcaloizilor în unele specii de *Aconitum* arată că aconitina este prezentă în toate organele plantei, de-alungul perioadei de vegetație. Spectrul cromatografic al alcaloizilor din diferitele organe a 2/3 din exemplarele de *A. romanicum* Wol. și a 1/2 din exemplarele de *A. tauricum* Wulf, recoltate în aceeași regiune, este diferit în luna aprilie față de iunie-octombrie, unul dintre alcaloizi migrînd în mai-octombrie din tuberele-mamă în tuberele-fiică.

S. Vasu

1825. CONSTANTINESCU E., ALBULESCU D., BALTĂ E., CHIRILĂ C., GEORGESCU M., NICOLAE F. și NICOLESCU V., *Studiul repartiției saponozidelor în diverse plante indigene aparținînd familiei Scrophulariaceae*, Farmacia, 1962 *10*, 613 — 618.

Aplicînd metoda gelatină-sînge pentru decelarea saponozidelor în speciile de *V. phlomoides* L., *V. thapsiforme Schrad.*, *V. nigrum*, L., *V. speciosum Schrad.* și *Scrophularia nodosa* L., recoltate în timpul înfloririi, autorii constată prezența saponozidelor în florile, frunzele și rădăcinile speciilor *V. nigricum* L. și *V. speciosum Schrad.* Cantitatea cea mai mare se găsește în flori și frunze, în rădăcini ele lipsesc în general și sînt total absente în tulpini. După vestejirea părții aeriene, rădăcinile sînt cele mai bogate organe în aceste principii active. Se fac recomandări privind recoltarea materialului vegetal necesar extragerii saponozidelor.

S. Vasu

IX. BIOCHIMIE ANIMALĂ

1826. DINU M., *Influența variațiilor termice asupra glicemiei la iepure*, Studii și cercet. biol., biol. anim., 1962, **XIV**, *4*, 507 — 516.

Experiențele au durat 402 zile și au fost făcute pe loturi de iepuri adulți de 14 luni și tineret de 40 de zile, fiecare lot cuprinzînd 24 de exemplare (12 femele și 12 masculi). Cu ajutorul metodei Hagedorn-Jensen s-a găsit că la iepurii de casă există un sistem glicoregulator din primele săptămîni de viață extrauterină. La iepurii adulți nivelul mediu anual al glicemiei este de 109,1 mg%, iar la tineret 104, 8 mg%. Diferențe notabile între cele două sexe apar numai primăvara și vara și sînt legate de activitatea sexuală. Schimbările condițiilor termice exterioare influențează metabolismul glucidic al organismului, cele mai scăzute valori înregistrîndu-se iarna (98 mg% la tineret și 101,5 mg% la adulți), cele mai ridicate vara (110 mg% la tineret și 114,5 mg% la adulți) și intermediare toamna și primăvara.

N. Moldoveanu

1827. CĂPÎLNĂ S., GHIZARI E. și ABABEI L., *Unele modificări în metabolismul glutaminei în ficatul și creierul de șobolan sub acțiunea ionilor metalici Mo și W*, Studii și cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *1*, 75 — 80.

Determinînd aminoacizii liberi și glutaminaza din omogenatele de ficat și creier de la șobolani injectați zilnic, timp de 100 zile, cu cîte 500 mg Mo și W, autorii au constatat că în timp ce în ficat Mo și W inhibă glutaminaza, în creier activitatea acestei enzime este inhibată numai de Mo pe cînd W o stimulează. Acțiunea Mo și W se explică prin oxidarea grupării — SH la grupa — S-S. Se discută posibilitatea ca Mo și W să atace selectiv aparatul mitocondrial.

H.D. Schell

1828. ABABEI L., SCHIAU S., GHIZARI E., CĂPÎLNĂ S., STOENESCU R. și ȘTEFĂNESCU P., *Influența radiațiilor ionizante asupra activității pirofosfatazei anorganice din creierul și ficatul de șoarece*, Studii și cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *1*, 81 — 87.

Supunînd șoareci albi unei iradieri totale cu raze X de 500 r, timp de 58 de min, și determinînd după 2, 24 și 48 de ore de la iradiere activitatea pirofosfatazei într-un omogenat total de creier și ficat, autorii au constatat o inhibare a acestei enzime în cele două organe studiate. Pirofosfataza din ficat este inhibată mai puternic și mai repede decît cea din creier. Locul de acțiune inhibitoare pare a fi grupările SH — ale enzimei. Se discută posibilitatea de acțiune a acestui efect și asupra altor compartimente ale metabolismului, în special în corelație cu metabolismul nucleoproteidelor.

H. D. Schell

1829. NICOLAESCU T., *Rolul beta-lipoproteinelor în transportul lipidelor absorbite digestiv (trioleina ^{131}I)*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *1*, 89 — 95.

În timpul hiperlipemiei postprandiale, trigliceridele (trioleina ^{131}I) sînt vehiculate timp de 2— 8 ore sub forma de betalipoproteine, concentraţia atingînd maximul la 2 ore. postprandial. Metoda folosită de autor este utilă pentru studiul formelor de absorbţie şi al transportului lipidelor.

H. D. Schell

1830. GHEORGHIU P., DOBRESCU D. şi UDREA P., *Cercetări asupra acţiunii procainei, APAB, lignocainei şi sulfasomidinei asupra creşterii adenocarcinomului Walker 256 la şobolan*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *1*, 117 — 123.

Procaina stimulează creşterea adenocarcinomului Walker 256 la şobolan. Acţiunea ei stimulatoare este mai accentuată decît aceea a acidului para-aminobenzoic (APAB). Sulfasomidina (elkosinul), un antimetabolit al procainei şi al APAB, inhibă complet acţiunea stimulatoare a procainei asupra carcinomului studiat. Lignocaina, anestezic local cu structură chimică deosebită de a procainei şi care nu eliberează APAB în organism, nu influenţează dezvoltarea tumorilor studiate.

H. D. Schell

1831. BENETATO GR., HĂULICĂ I., ZAMFIRESCU N. R., BUBUIANU GH., FELBERG B. şi COVĂSNEANU Z., *Efectul central al adrenalinei asupra catecolaminelor sangvine*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *2*, 177 — 186.

Studiind cu ajutorul metodei „capului izolat", pe cîini, efectul central al adrenalinei asupra eliberării de catecolamine în raport cu variaţiile glicemiei, autorii au arătat că în condiţiile de normo- şi hipoglicemie, adrenalina acţionînd central asupra capului izolat, determină o creştere evidentă a catecolaminelor din trunchiul animalelor, datorită efectului de „feed-back" pozitiv pe care îl exercită asupra centrilor adrenalino-secretori şi al celor simpatico-adrenergici. În condiţii de hiperglicemie adrenalina, din contră, exercită un efect de „feed-back" negativ asupra secreţiei de adrenalină, fără ca producţia de noradrenalină să scadă prea mult.

H. D. Schell

1832. PĂUŞESCU E., IONESCU M. şi TRANDAFIRESCU E., *Activitatea aminooxidazică a unor ţesuturi în cursul hipotermiei profunde*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *2*, 199 — 212.

La temperatura de 36°C între cele patru ţesuturi studiate există un gradient al consumului total de oxigen şi al activităţii monoaminoxidazice (MAO), pe baza căruia acestea pot fi seriate în ordine descrescîndă în felul următor : rinichi, ficat, cord, muşchi scheletici. În cursul

coborîrii temperaturii, scăderea consumului global de oxigen şi a activităţii MAO este diferită ca amploare şi evoluţie de la un ţesut la altul, astfel încît la 6°C ele se grupează în ordinea descrescîndă altfel decît la 36°C: cord, rinichi, muşchi scheletici şi ficat. La sfîrşitul reîncălzirii organismului se constată o creştere a activităţii MAO în ficat, modificări semnificative ale acesteia în miocard şi rinichi şi scăderea ei în muşchii scheletici.

H. D. Schell

1833. VELICAN C. şi VELICAN D., *Biologia procesului de scleroză. Nota XI. Histochimia unor complexe glucido-protidice şi scleroproteine din ţesutul conjunctiv al splinei normale şi patologice*, Studii şi cercet. med. int., 1963, **IV**, *2*, 199 — 206.

S-au cercetat din punct de vedere histochimic unele complexe glucido-protidice şi scleroproteine din interstiţiul conjunctiv al splinei. S-a constatat în pulpa roşie prezenţa complexelor glucido-protidice fibrilare care nu conţin colagen şi sînt bogate în mucopolizaharide neutre şi în acizi sialici. În pulpa albă s-a constatat prezenţa fibrelor colagenice şi a colagenului neutrosolubil precum şi cantităţi mai reduse de mucopolizaharide neutre şi acizi sialici. Adventicea vaselor conţine colagen insolubil. Trabeculii şi capsula conţin colagen acidosolubil, insolubil, mucopolizaharide neutre şi condroitinsulfaţi. Rezultatele obţinute ar putea explica raritatea dezvoltării fibrozei în pulpa roşie, ca şi alte particularităţi fiziopatologice.

C. Iordache

1834. POPESCU I. GR., ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., VELICAN D., RUNCAN V. şi VLĂDESCU C., *Încercări de terapie curativă cu enzime energetice şi juvocirol în hepatita cronică toxică experimentală*, Studii şi cercet. med. int., 1963, **IV**, *2*, 219—223.

Se prezintă încercările experimentale de utilizare terapeutică, prin injecţii intravenoase, a unor enzime energetice ca citocromul C, DPN factor coenzimatic, catalaza şi glucoxidaza, asociate sau nu cu hidrolizatul proteic juvocirol. Administrarea lor la iepuri cu leziuni hepatice produse prin intoxicare cu CCl_4 este ineficientă. Formula de asociaţie enzime energetice + juvocirol este chiar nocivă.

C. Iordache

X. BIOCHIMIE MEDICALĂ

1835. CIPLEA AL., BUBUIANU GH. şi GĂLĂŞANU E., *Studiul catecolaminelor din L. C. R. în boala hipertensivă*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, *1*, 97 — 109.

Studiind pe 24 de bolnavi cu hipertensiune arterială esenţială catecolaminele din L. C. R. paralel cu cele din sînge, autorii constată că lichidul cefalo-rahidian la om conţine 4,5 — 5 mg/l catecolamine, faţă de 1,15 mg/l din sînge, atît la omul normal cît şi la cel bolnav. În cazul

adrenalinei se constată însă un procentaj ridicat în lichidul cefalo-rahidian la bolnavii cu hipertensiune arterială esenţială ceea ce pune problema modului de apariţie şi a efectului ei asupra sistemului nervos central.

H. D. Schell

1836. PĂUN R., PAPPO A., ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., MIRON C., VASILIU I. şi SUCHIANU GH., *Criterii de diagnostic precoce al hepatitei cronice consecutive hepatitei epidemice*, Studii şi cercet. med. int., 1963, **IV**, *2*, 161 — 168.

Indicii clinico-biologici cei mai precoci în diagnosticul hepatitei cronice consecutive hepatitei epidemice, sînt : timolul, Takata, hipergamaglobulinemia, micşorarea raportului serino-globulinic, hiperaldolazemia. Hiposerinemia a apărut din primul an aproape în toate cazurile de hepatită cronică.

C. Iordache

1837. POPESCU I., ZAMFIRESCU GHEORGHIU M., DOBREANU-ENESCU V., CIOBANU F. şi HARNAGEA P., *Contribuţii la studiul acidului piruvic sangvin în insuficienţa cardiacă*, Studii şi cercet. med. int., 1963, **IV**, *2*, 187 — 198.

Studiindu-se 44 de cazuri diferite de insuficienţă cardiacă, s-a constatat că piruvicemia a fost crescută mai ales în formele cronice greu reductibile, şi normală în formele recente sau în insuficienţele ventriculare stîngi. Hiperpiruvicemia se întîlneşte în insuficienţele cardiace pe fond metabolic, în special în cardiotireoze, insuficienţe cardiace globale cronice şi în cordul pulmonar cronic. Autorii deduc o insuficienţă a proceselor de decarboxilare şi propun un tratament adjuvant cu cocarboxilază.

C. Iordache

1838. STEINBACH M., GEORGESCU M., VASILIU I., ECONOMU C. şi LAZAROVICI M., *Cercetări privind metabolismul lipidic la lucrători cu suprasolicitare nervoasă (telefoniste)*, Studii şi cercet. med. int., 1963, **IV**, *2*, 207 — 210.

S-au dozat colesterolemia, lipemia totală β/α lipoproteinele şi testul Kunkel, la lucrătoarele dintr-o mare centrală telefonică atît dimineaţa înainte de începerea lucrului, cît şi sub influenţa muncii. Lotul martor pentru valorile de bază ale aceloraşi indici biochimici a fost constituit dintr-un grup de lucrătoare sanitare. Rezultatele obţinute arată că nu există nici o diferenţă semnificativă între valorile indicilor biochimici la telefoniste şi acelea ale grupului martor. Autorii ajung la concluzia că lucrul în centralele telefonice nu produce o modificare a metabolismului lipidelor care ar contribui la patogenia aterosclerozei.

C. Iordache

1839. CONSTANTINESCU E., LUCA M. şi VOINESCU I., *Cercetări electroforetice serice în evoluţia accidentelor cerebrale vasculare*, Studii şi cercet. neurol., 1962, **VII**, *3*, 335 — 340.

S-au cercetat proteinemia şi fracţiunile electroforetice la 35 bolnavi cu ictus cerebral, recent grav, 12 cu accidente vasculare hemoragice şi 23 cu accidente vasculare ischemice (21 tromboze şi 2 embolii). S-a constatat o creştere masivă a fracţiunilor α_1 şi α_2 globulinice şi o creştere moderată a fracţiunilor β şi γ globulinice la bolnavii cu accidente hemoragice şi accentuată la cei cu accidente ischemice. Paralel s-a găsit şi o hipoalbuminemie compensatoare la cele două grupe de bolnavi. La bolnavii ameliorați după tratament, fracţiunile albuminice şi α_1 şi α_2 globulinice tind să revină la normal, în timp ce înainte de decedare survine o accentuare a tulburărilor menţionate.

N. Moldoveanu

1840. GEORGESCU P., POPESCU I. şi PĂUNESCU E., *Modificările lipidelor serice în tuberculoza pulmonară gravă, complicată cu amiloidoză renală*, Ftiziol., 1963, **XII**, *1*, 35 — 40.

Dacă tuberculoza gravă se complică prin amiloidoză renală, apare o hipercolesterolemie moderată, în timp ce lipemia rămîne normală, ceea ce contribuie la diferenţierea de nefroza lipoidică. Existenţa în cadrul amiloidazei renale atît a unei hiperlipemii, cît şi a unei hipercolesterolemii, presupune asocierea nefrozei amiloide cu nefroza lipoidică. Scăderea raportului colesterol esterificat/colesterol total are loc în mod constant în cazurile de amiloidoză ce complică tuberculoza şi trebuie considerată ca o tulburare funcţională hepatică, datorită asocierii dintre tuberculoză şi amiloidoză. Hipoalbuminemia nu este însoţită de hiperlipemie totală, ci doar de hipercolesterolemie, însă numai în cazurile cînd hipoalbuminemia este marcată.

D. Moţet-Grigoraş

1841. MARMOR I., RACZ T. şi SZABO I., *Tulburări ale metabolismului apei şi sodiului în decursul bronchopneumoniei sugarului*, Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1962, **LXVI**, *3*, 607 — 614.

Din 30 de sugari cu bronchopneumonie cercetaţi, 90% prezintă o puternică hipernatremie care urmează creşterii temperaturii.

A. Batcu

1842. STRAT C., MADARE G., DRĂGAN M., ILARIONF L., POPESCU N., CRUPENSCHI L. şi COBEŢ I., *Contribuţii la studiul mucoproteinelor sërice în boala reumatismală*, Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1962, **LXVI**, *4*, 867—872.

Dozarea mucoproteinelor serului la reumatici este un test util pentru diagnostic şi pentru aprecierea eficacităţii tratamentului. În reumatismul poliarticular acut, cu şi fără prinderea

cordului se constată o creştere a mucoproteinelor (determinate prin metoda Varay Masson) de la 60 — 65 mg‰, cît este conţinutul normal, la 80 — 182 mg‰. Variaţiile mucoproteinelor serului sînt mai fidele ca V. S. H., cu care concordă în oarecare măsură.

A. Batcu

1843. MARMOR I., RACZ T. şi SZABO I., *Tulburări ale metabolismului potasiului în decursul bronchopneumoniei sugarului*, Rev. medico-chirurgic., Iaşi, 1962, **LXVI**, *4*, 895 — 902.

Deoarece în bronchopneumoniile grave se constată la copii, în unele cazuri, o hipopotasemie extremă, iar în altele hiperpotasemie, autorii recomandă ca administrarea sărurilor de potasiu pe cale parenterală să se facă numai după un riguros control de laborator, în aceste cazuri electrocardiograma neputînd da date exacte asupra potasemiei.

A. Batcu

XI. BIOCHIMIA NUTRIŢIEI

1844. DINU M., VERMEŞANU N. şi PĂDURARU I., *Influenţa naturii proteinelor din raţiile cu conţinut ridicat de porumb asupra caracteristicilor fizico-chimice ale carcasei la suine*, Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1962, **XIV**, *3*, 412 — 434.

La porcii hrăniţi cu porumb asociat cu drojdie de bere uscată, în comparaţie cu cei hrăniţi cu porumb-făină de sînge, se constată creşterea procentajului de grăsime şi diminuarea proteinelor ţesutului muscular, de asemenea scăderea substanţelor neextractibile şi creşterea substanţelor grase din slănină. Hrănirea cu drojdie duce la scăderea consistenţei grăsimii (scade punctul de topire şi creşte indicele de iod), iar conţinutul ei în substanţe grase prezintă valori apropiate de acelea ale osînzei. Asocierea porumbului cu nutreţuri proteice are un efect pozitiv, ducînd la creşterea substanţelor proteice din carne şi scăderea substanţelor grase din slănină. În privinţa nutreţului complimentar al porumbului, autorii stabilesc următoarea ierarhie în ordinea descrescătoare a valorii : nutreţ de origine animală, microorganică şi de origine vegetală.

N. Moldoveanu

1845. NICHITA G. şi BURLACU G., *Contribuţii la studiul acţiunii dinamice specifice a metabolitelor din hrană. Cercetări experimentale pe păsări*, Studii şi cercet. biol., biol. anim., 1962, **XIV**, *4*, 495 — 506.

Valorile acţiunii dinamice a metabolitelor determinate pentru 100 kcal digerate sînt următoarele : 3,75 kcal % pentru amidon, 2,68 kcal % pentru glucoză, 6,2 kcal % pentru cazeină, 1,61 kcal % pentru lipidele din unt şi 5,81 kcal % pentru amestecul cazeină-amidon-unt.

N. Moldoveanu

1846. LUPEA V. şi BODEANU V., *Contribuţii la studiul conţinutului în cupru al pîinii obţinute din făina de diferite extracţii*, Farmacia, 1962, *4*, 239 — 242.

Determinările au fost efectuate pe pîine albă, integrală şi neagră, indicînd un conţinut în Cu de 169,7 — 290,3γ 100 g pîine proaspătă. Autorii ajung la concluzia că numai pîinea nu poate asigura necesarul de Cu al unui adult în timp de 24 de ore şi recomandă pentru consum pîinea integrală care este mai bine asimilată de om şi conţine o cantitate mai mare de Cu.

S. Vasu

1847. FODOR GY., BEDŐ K., LÁZÁR I. şi LOSONCZY I., *Cercetări comparative privind valoarea nutritivă a algelor verzi monocelulare şi a cazeinei*, Rev. med., Tg. Mureş, 1963, *1*, 50—53.

Urmărind creşterea în greutate a şobolanilor hrăniţi cu praf de alge verzi (*Scenedesmus*), în comparaţie cu un lot martor hrănit cu un regim alimentar semisintetic (cazeină, amidon, drojdie crudă, ulei comestibil, agar-agar şi săruri minerale), autorii constată la cei dintîi un spor de 13,65% faţă de martori, ceea ce ilustrează, după autori, superioritatea calitativă a proteinelor din praful de alge.

S. Vasu

XII. BIOCHIMIE TEHNICĂ

1848. ALEXIU A., *Curbele de absorbţie a vinurilor roşii şi în curs de învechire.*, Lucr. şt., I.C.H.V., 1960 — 1961, **IV**, 483 — 490.

Studierea spectrofotometrică în spectrul vizibil a coloraţiei vinurilor roşii a arătat că prin învechire creşte proporţia pigmenţilor galbeni şi roşii, faţă de ceilalţi pigmenţi. S-au stabilit diferenţe privind intensitatea şi nuanţa coloraţiei între grupele de soiuri nobile, hibrizi producători de hibrizi noi, cît şi între soiurile din interiorul unei grupe. Condiţiile pedoclimatice şi tehnologia vinificaţiei influenţează puternic intensitatea coloraţiei şi nuanţa ei.

H. Filipescu

1849. METLIŢKI L. V., *Aspecte biochimice ale metodei de conservare a produselor alimentare prin iradiere*, An. rom.-sov., biol., 1963, *3*, 3 — 20.

Prin iradierea produselor alimentare se previn o serie de pierderi, însă în detrimentul unor însuşiri pozitive. Astfel, iradierea cartofilor înlătură încolţirea micşorînd în acelaşi timp rezistenţa faţă de microorganisme, iar menţinerea culorii şi vitaminelor în carnea iradiată este însoţită de pierderea gustului şi mirosului etc. Se relevă importanţa cercetării acţiunii chimico-fiziologice, a radiaţiilor ionizante, pentru cunoaşterea unor procese care se desfăşoară în produsele alimentare şi pentru elaborarea unor noi metode de conservare a alimentelor şi perfecţionarea celor existente.

S. Vasu

XIII. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

1850. TEITEL A., STROESCU V., MANOLESCU EM. şi ŞTEFLEA D., *Studiul farmacologic comparativ al izoprenalinei şi al 3-metileterului izoprenalinei*, Studii şi cercet. fiziol., 1963, **VIII**, 2, 213 — 222.

Din rezultatele obţinute pe diferite animale (broaşte, şoricei, şobolani, cobai, iepuri, cîini), autorii consideră că metileterul izoprenalinei ar putea fi folosit în mod avantajos în terapeutică deoarece posedă o acţiune bronhodilatatoare pronunţată şi în acelaşi timp o toxicitate şi o acţiune cardiostimulatoare mai redusă decît a izoprenalinei.

H. D. Schell

SIMPOZIONUL „STANDARDIZAREA METODELOR BIOCHIMICE MEDICALE"

În zilele de 27 şi 28 septembrie 1963 a avut loc în Bucureşti simpozionul „Standardizarea metodelor biochimice medicale". Simpozionul a fost organizat de către Secţia de biochimie a Societăţii de fiziologie, în colaborare cu secţia de laborator clinic a Societăţii de patologie infecţioasă din Uniunea Societăţilor de Ştiinţe Medicale din R. P. R. La lucrări a luat parte o numeroasă asistenţă, atît din Bucureşti cît şi din principalele centre din ţară. S-au ţinut un număr de şapte şedinţe, prezidate succesiv de către acad. Gr. Benetato, prof. A. Ionescu-Matiu, prof. Stoian Ionescu, Alex. Ciplea, prof. M. Mezincescu, prof. I. Manta şi acad. E. Macovschi.

Lucrările simpozionului au fost deschise de către acad. Gr. Benetato, preşedintele Societăţii de fiziologie a U. S. S. M. Din partea conducerii U. S. S. M. a luat cuvîntul prof. N. Nestorescu, iar din partea Secţiei de biochimie acad. E. Macovschi.

A participat ca reprezentat al M. I. C. P., directorul general Gh. Alupului şi din partea M. S. P. S. directorul general V. Ionescu şi director adjunct O. Constantinescu.

Au fost prezentate următoarele rapoarte :

1) Prof. Th. Ilea, prof. S. Oeriu, Gh. Tănăsescu şi G. Ivanovici (Bucureşti) : *„Poziţia actuală a laboratoarelor de biochimie din Capitală faţă de problema standardizării metodelor de lucru"*.

Raportorii au analizat structura organizatorică sanitară şi posibilităţile aplicării standardizării în biochimie. În continuare, au arătat condiţiile necesare standardizării în laboratoarele de biochimie din Capitală, referindu-se la baza materială şi la funcţionalitatea acestor laboratoare : profil de analize, metode, reactivi, cadre.

În vederea standardizării, autorii referatului au făcut o serie de propuneri ca :

a) efectuarea standardizării să fie bazată pe realităţile de pe teren ;

b) standardizarea să se facă pe etape, pornindu-se de la condiţiile existente ;

c) metodele propuse să fie discutate şi analizate de către un grup de specialişti şi clinicieni ;

d) să se elaboreze şi să se difuzeze caiete periodice de tehnici de laborator ;

e) pentru început să se facă o standardizare experimentală într-un raion sau două din Capitală.

2) Prof. I. Manta (I. M. F. Cluj) : „*Asupra unor aspecte ale laboratorului biochimic clinic în legătură cu standardizarea metodelor*".

După un istoric al laboratoarelor de biochimie, autorul s-a ocupat de erorile care se pot produce în analizele biochimice, de interpretarea rezultatelor laboratorului clinic, precum și de necesitatea raționalizării și standardizării metodelor. În metodele standardizate desfășurarea procesului chimic trebuie minuțios precizată. Metodele trebuie să fie simple, necesitînd aparatură uzuală, să fie cît mai puțin laborioase și, pe cît posibil semi sau microanalitice.

3) Alex. Ciplea (I. M. F. București) : „*Colaborarea dintre clinică și laboratorul de biochimie*".

Autorul a prezentat un istoric din care a reieșit rolul laboratorului clinic în eliminarea empirismului din medicină. În continuare a arătat necesitatea unui învățămînt în care după terminarea facultății de chimie, cadrele destinate laboratorului clinic să se specializeze prin audierea unor cursuri organizate de una din facultățile de medicină generală, cu cursuri speciale la fiecare laborator și clinică. Biochimistul va primi totodată o pregătire la patul bolnavului.

Dat fiind rolul important al biochimistului, între el și clinician trebuie să existe raporturi de colaborare. Șeful laboratorului de biochimie trebuie să țină o strînsă legătură cu clinica. El trebuie să asiste programat la vizite și să participe la stabilirea explorărilor necesare pentru diagnostic.

Au urmat apoi referatele și comunicările, grupate în modul următor : proteine, enzime, oligoelemente, glucide și lipide, electroliți și hormoni. În fiecare grupă, seria comunicărilor a fost precedată de către un referat general.

PROTEINE

Înaintea comunicărilor au fost prezentate, de către M. Zamfirescu-Gheorghiu și A. Popescu (Institutul de medicină internă, București) referatele : „*Proteinele și derivații azotați*" și „*Glicoproteinele în clinică*".

În primul referat, autorii au făcut o prezentare a metodelor folosite în determinarea proteinemiei totale și a fibrinogenului, a proteinelor în alte lichide biologice, a metodelor de cercetare a echilibrului proteinic plasmatic, precum și a metodelor de dozare a ureei, azotului rezidual, acidului uric, creatinei, creatininei și aminoacizilor. Dintre aceste metode, autorii au recomandat pe cele mai potrivite pentru fiecare determinare în parte.

În cel de-al doilea referat, după o clasificare a glicoproteinelor, au prezentat de asemenea metodele de dozare și au arătat care sînt cele mai indicate pentru laboratorul clinic.

În continuare au fost făcut comunicările :

A. Popescu (Institutul de medicină internă, București) : „*Ureometrul*".

S-a prezentat un ureometru simplificat, economic cu manipulare ușoară, intrat deja, cu bune rezultate, în practică la numeroase clinici din țară.

M. Dragomirescu (I. M. F. Timișoara) : „*Biofactori modificatori ai probelor de precipitare*". Mici cantități de bilă (sau acizi biliari) în concentrație de 2 — 20% sînt capabile ca prin incubare la 20 și 37°C, timp de 24 de ore, să diminueze flocularea timolică și să crească precipitarea fenolică la serurile provenite de la bolnavii de hepatită epidemică. Acest

fapt pune în discuție valoarea probelor de disproteinemie la hepaticii cu o pronunțată componență de stază biliară.

E. Păunescu (Institutul de ftiziologie, București) : *„Avantajele și limitele unei tehnici colorimetrice de dozare a grupărilor aminice libere în produsele biologice"*. Utilizarea unui reactiv alcoolic cu ninhidrină în mediu neutru, tamponat, și folosirea unui stabilizator al culorii (EDTA) permit aprecierea, cu suficientă sensibilitate, a concentrației globale de aminoacizi dintr-un produs biologic. Prezența ureei, guanidelor, purinelor și amidelor nu influențează rezultatele determinării. Triptofanul este evidențiat numai în proporție de 77 — 82%. Metoda fiind rapidă, simplă și sensibilă, se recomandă în laboratorul clinic.

E. Kifor, E. Kotay Lakatos (Clin. med. Tg. Mureș) : *„Studiul comparativ al diferitelor metode de determinare a fibrinei"*. Rezultatele diferă după metodele folosite. Cele obținute prin metoda gravimetrică sînt considerabil mai mari decît rezultatele obținute prin celelalte metode. Fibrina fixează calciul și acest fapt este un factor de erori.

A. Popescu (Institutul de medicină internă, București) : *„Metodă gravimetrică simplificată de dozare a fibrinogenului"*. Se elimină o serie de timpi laborioși din metoda clasică, fără a se afecta precizia metodei.

G. Florovici, E. Dumitriu, V. Constantinescu (Spitalul nr. 1, Craiova) : *„Electroforeza pe hîrtie în extensie orizontală, cu modificarea timpului de migrare"*. Se obține scurtarea timpului prin mărirea intensității de curent, utilizînd răcirea prin introducerea în cuvă a unui vas cu gheață. Pe hîrtie se aplică un strat de geloză 1,5%.

M. Zamfirescu-Gheorghiu, M. M. Popa, R. Olinescu, C. Vlădescu, S. Nițescu și St. Kircev (Institutul de medicină internă, București) : *„Valoarea practică a metodei de dozare a ureei cu diacetil monoximă"*. Metoda necesită un volum mic de ser sau sînge și este extrem de simplă, dar de la valori de 4 mg% în sus trebuie cuplată cu altă metodă de uz clinic curent, pentru a se putea garanta exactitatea rezultatelor.

M. Elias (Timișoara) : *„Contribuții la problema stabilirii valorilor normale și patologice ale proteinelor serice la copil"*. Se prezintă rezultatele a aproximativ 1000 determinări electroforetice pe hîrtie și se analizează precizia diferitelor metode de evaluare cantitativă a electroforegramelor, discutîndu-se aspectul metodologic al standardizării acestor metode.

ENZIME

Comunicările au fost precedate de un referat general prezentat de M. Zamfirescu-Gheorghiu (Institutul de medicină internă, București) : *„Teste enzimatice în clinică"*. În referat se descriu metodele curente de dozare a enzimelor plasmatice (fosfataze, colinesteraza, transaminaza glutamică și piruvică, lacticodehidraza) și a enzimelor digestive (ca amilaza, lipaza, tripsina și uropepsinogenul).

Au urmat comunicările :

S. Comoroșan, S. Solomon, M. Stănescu (Lab. de biochimie, Spit. Clin. Fundeni — București) : *„Surse de erori în activitatea dehidrazelor N. A. D. și N. A. P. D. dependente în structurile biologice și particulele subcelulare"*. S-a cercetat activitatea dehidrazelor NAD și

NAPD dependente pe diferite structuri biologice. S-a cercetat influența diverșilor parameți care intervin în metodele de dozare a enzimelor : compoziția mediilor de reacție, swellingul mitocondrial, influența timpului și acțiunea unei game de detergenți ionogeni și neionogeni.

Th. Porsche (Lab. fiziopat., Timișoara): *„Dispozitiv optic pentru determinări enzimatice cu ajutorul fotometrului Pulfrich în u. v.”*. Se descrie un dispozitiv simplu, adaptabil la fotometrele Pulfrich și I. O. R. Dispozitivul permite prima aplicare de acest gen a fluorescenței în fotometrie.

S. M. Idu, L. Cociumian și M. Munteanu (Clin. med. Colțea, București) : *„Cercetări asupra a două metode de dozare a transaminazelor serice executate în paralel”*. Se compară o metodă proprie, reprezentînd o variantă a metodei Tonhazi, cu metoda Reitman și Frankel. Metoda proprie se bazează pe următorul principiu : acidul oxalilacetic produs prin transaminare este decarboxilat cu citrat de anilină, iar acidul piruvic rezultat este extras și dozat ca hidrazonă, în mediu alcalin. Se constată un paralelism aproape perfect. Se discută avantajele fiecărei metode în parte. Metoda proprie este aplicabilă acolo unde sînt spectrofotometre sau fotometre. Metoda Reitman și Frankel este utilizabilă și în cazul laboratoarelor mai puțin dotate.

E. Kifor, A. Fall și L. Kasza (Clin. boli contagioase, Tg. Mureș) : *„Determinarea activității fosfatazei alcaline din serul diluat”*. Diluînd serul s-a obținut creșterea fosfatazei alcaline, probabil prin eliminarea acțiunii unor inhibitori prezenți mai ales în cazul de ictere mecanice. Prin această metodă s-au obținut rezultate mai sigure decît prin metoda Bodanski.

P. Georgescu (Inst. ftiziologie, București) : *„Erori posibile în interpretarea rezultatelor dozării transaminazelor T. G. O. la bolnavii tratați cu hidrazidă (H. I. N) și Vitamină B_6”*. Administrarea prelungită a dozei de 10 mg/kg corp pe zi de H. I. N. duce la eliminarea crescută a vitaminei B_6 și, consecutiv, la scăderea activității T. G. O. Administrarea concomitentă a piridoxinei menține T. G. O. în limitele normale.

OLIGOELEMENTE

Comunicările au fost precedate de un referat :

B. Nestorescu (Clin. boli profesionale — București) : *„Substanțe toxice-microelemente”*. În cadrul acestui referat, autorul a arătat cele mai potrivite metode pentru următoarele dozări :

Toxice industriale : Pb, Hg, As, carboxihemoglobină, etanol, metanol, *p*-nitrofenol.

Substanțe terapeutice : barbiturați, alcaloizi.

Microelemente : Cu, Co, Zn, Fe nehemoglobinic, F, I.

Au urmat comunicările :

E. Predatu și C. Roman (Spit. unif., Craiova) : *„Aprecieri asupra metodelor de dozare a ionilor și rezultatele obținute prin aplicarea lor”*. S-a prezentat experiența laboratorului în următoarele determinări : potasiu — metoda Krammer Tisdall ; sodiu — gravimetric, precipitarea făcîndu-se cu reactivul Albanese și Leine, cu o concentrație scăzută ; calciu — înlocuindu-se murexidul cu „Calcona”.

I. Szantai, Z. Uray, T. Holan (I.M.F. Cluj) : *„Metodă rapidă pentru executarea indicelui de conversiune a iodului mineral în iod proteic marcat cu ^{131}I"*. În locul metodelor curente de precipitare, autorii folosesc la determinarea ^{131}I legat de proteine schimbătorii de ioni Merk II de tip anionic sub forma Cl^-. Rezultatele sînt perfect superpozabile cu acelea date de metodele clasice.

G. Ivanovici şi M. Faur (Spit. Brîncovenesc, Bucureşti) : *„Metodă rapidă pentru determinarea chimismului gastric cu histamină"*. Autorii prezintă propria experienţă în utilizarea metodei şi o recomandă pentru laboratoarele clinice.

GLUCIDE

S-a prezentat referatul : Gh. Tănăsescu (I.M.F. — Bucureşti) şi C. Pohoran (I.M.F. Bucureşti şi M.S.P.S.). *„Metode pentru determinarea glicemiei şi glicozuriei în laboratorul clinic"*. Se fac recomandări asupra recoltării sîngelui şi se prezintă cele trei categorii de metode de determinare a lipidelor, bazate pe reacţii de oxidoreducere, pe reacţii de condensare, pe reacţii enzimatice.

Se prezintă apoi metodele de dozare a glucidelor urinare, şi anume recunoaşterea glucidelor reducătoare şi identificarea tipurilor de glucide. Se fac recomandări asupra celor mai adecuate metode.

Au urmat comunicările :

S. V. Gheţie şi E. A. Tripcovici (Clin. pediatrie „E. Irza", Bucureşti) : *„Determinarea glucidelor în lichide biologice prin reacţia cu o-toluidină"*. Metoda se pretează la determinări în toate lichidele biologice, este rapidă, specifică şi poate fi aplicată în orice laborator clinic. Aportul personal constă în :

— obţinerea unei reacţii de culoare mai intense, prin modificarea raportului între reactiv şi lichidul biologic ;

— se poate folosi pentru determinări serul sanguin ;

— se arată că NaF scade intensitatea reacţiei de culoare şi deci nu trebuie folosită la recoltare ;

— s-a făcut un protocol unic, cu aceiaşi reactivi, pentru determinări în ser, urină şi l.c.r. ;

— s-au stabilit valorile normale ;

— s-a arătat că pentozele dau o reacţie de culoare diferită şi deci metoda poate fi folosită pentru dozarea acestora.

C. Quint şi C. Manoviciu (Timişoara) : *„Micrometodă pentru dozarea rapidă a glucozei"*. Se prezintă şi se analizează o micrometodă bazată pe reducerea picratului de sodiu la picramat de sodiu.

LIPIDE

Comunicările în domeniul lipidelor au fost precedate de referatul : S. M. Idu (Clin. med. Colţea, Bucureşti) : *„Teste de laborator în explorarea metabolismului lipidic"*. Autorul prezintă metodele de determinare a lipemiei, acizilor graşi totali, lipidogramelor, colesterolemiei, fosfo-

lipidelor şi β-lipoproteinelor. Se prezintă de asemenea testul fenolic Kunkel, indicele de turbiditate şi clarificare la heparină, arătîndu-se posibilităţile de eroare şi modul de a le evita.

Au urmat comunicările :

S. M. Idu şi L. Cociumian (Spit. Colţea, Bucureşti) : *„Metodă pentru colorarea lipoproteinelor serice înainte de separarea lor prin electroforeza pe hîrtie"*. Precolorarea se face folosindu-se dioxan-propilen-glicolul ca solvent pentru negrul de Sudan. În acest mod coloraţia devine mai intensă. Se obţin trei fracţiuni. Erorile deformărilor de spoturi se elimină în cea mai mare parte prin folosirea metodei eluţiei. Reproductibilitatea este mai bună decît în alte tehnici.

E. Miclescu şi G. Florovici, lab. A. Deliu (Spit. nr. 1, Craiova) : *„Metode de dozare a lipidelor totale în ser, efectuate în laboratorul Spitalului nr. 1 Craiova"*. Se redă experienţa cîştigată în aplicarea metodei Mata Manuel şi a celei bazată pe extracţia lipidelor totale cu alcool eter-cloroform, urmată de dozarea gravimetrică sau colorimetrică (cu Sudan III) a lipidelor extrase.

M. Elias, S. Elias, V. Gligor, B. Broşteanu şi I. Venezal (Timişoara) : *„Contribuţii la problema de standardizare a dozării colesterinei din serul sanguin"*. Se analizează cu ajutorul calculului statistic precizia a 4 metode de dozare a colesterinei totale din serul sanguin.

S. Elias, V. Gligor şi M. Elias (Timişoara) : *„Contribuţii la problema colesterinemiei normale şi patologice la copil"*. Se analizează statistic un material vast.

D. Bolcaş (Oradea) : *„Contribuţii la studiul semnificaţiei clinice a reacţiei Mallen"*. Reacţia are un grad mare de specificitate pentru hipergama-globulinemii, pozitivitatea crescînd o dată cu creşterea alfa-2-globulinelor şi a unor lipoproteine. Pozitivarea are loc proporţional cu creşterea fosfolipidelor.

ELECTROLIŢI ŞI HORMONI

Referatul în domeniul electroliţilor, alcătuit de conf. A. Batcu, I. Mărculescu şi F. Şerban (I.M.F., Iaşi), este întitulat : *„Explorarea metabolismului hidro-electrolitic"*. Autorii au făcut o documentată prezentare teoretică a problemei, după care au recomandat metodele cele mai indicate pentru fiecare determinare în parte.

Au urmat comunicările :

S. Comoroşan, O. Macarie, M. Beroniade şi A. Panaite (Spit. clin. Fundeni, Bucureşti) : *„Explorarea metabolismului hidroelectrolitic în afecţiuni renale şi cardiace"*. Se face o investigare complexă a metabolismului hidro-electrolitic şi a echilibrului acido-bazic, pe baza determinării concentraţiei electroliţilor în umori, a rezistivităţii, punctului crioscopic, pH-ului, bazelor tampon, bicarbonaţilor şi coeficienţilor de clearance, pe 3 loturi de afecţiuni : cardiace, renale compensate şi renale decompensate. Se analizează principalele variaţii observate, precum şi eventualele mecanisme biochimice care stau la baza lor.

N. Sterescu, A. Stancu, L. Stoenescu şi as. tehn. E. Mihai (Inst. de fiziologie, Bucureşti) : *„Determinarea cantitativă a hormonilor tiroidieni marcaţi, eliberaţi în circulaţie, prin tehnica canulării venei tiroidiene inferioare"*. S-a pus în evidenţă influenţa clorpromazinei asupra reactivităţii tiroidei la hormonul tireotrop, influenţa temperaturii asupra aceluiaşi

fenomen, acțiunea hormonului tireotrop asupra eliberării de iod anorganic din glanda tiroidă, acțiunea insulinei și a vasopresinei asupra eliberării de hormoni tiroidieni marcați în efluentul venos tiroidian.

I. Vasilescu, M. Dragomirescu, M. Vîlceanu și L. Dragomirescu (I.M.F., Timișoara): *„Observații privind modificarea excreției urinare a 17-cetosteroizilor în orhita urliană"*. Excreția urinară a *17*-cetosteroizilor scade. Modificarea maximă are loc în primele zile. Afectarea endocrină e relativ mai importantă la grupele de bolnavi sub 20 de ani. Urmărirea dinamică a eliminării *17*-cetosteroizilor poate constitui un test de laborator cu referire la importanța și durata disfuncției gonadice.

St. Ilea (Spit. unif., Lugoj): *„Metodă simplă pentru dozarea pregnandiolului urinar"*. Se prezintă o tehnică bazată pe hidroliza acidă a urinei în prezența toluolului ca agent de extracție și a unei cantități mici de hexametilentetramină, care împiedică dizolvarea cromogenilor în toluen. Extractul se spală cu NaOH și se aduce la sec, efectuîndu-se apoi reacția de culoare cu H_2SO_4.

P. Ciurdaru, T. Ghircoiașu și E. Sopon (Clin. med. II, I.M.F. Cluj): *„Surse de erori în analizele biochimice care duc la neconcordarea cu diagnosticul clinic"*. Se arată erorile datorite recoltării, efectuării cu întîrziere a analizelor, lipsei de colaborare dintre clinică și laboratorul de biochimie, manoperii și interpretării.

S. Elias (Lab. embriologie, Timișoara): *„Calcularea și folosirea curbelor de etalonare"*.

Discuțiile care au urmat după prezentarea comunicărilor au arătat utilitatea simpozionului și necesitatea standardizării metodelor de laborator clinic.

Prof. I. Ionescu-Matiu (București), după ce a arătat că acest simpozion coincide cu centenarul primului laborator de chimie de stat din țara noastră, a arătat importanța chimiei pentru medicină și marea dezvoltare pe care au căpătat-o laboratoarele de biochimie în țara noastră. În încheiere, a mulțumit U.S.S.M. și Comitetului de organizare pentru inițierea acestui simpozion.

I. Cosmulescu (Spit. I. C. Frimu, București) a vorbit despre necesitatea întăririi laboratorului de policlinică și a utilării lui pentru explorări de finețe la ambulatorii. Problema protecției muncii în laboratoare reprezintă de asemenea un punct care trebuie să fie luat în considerație. Personalul laboratoarelor clinice trebuie să-și ridice permanent nivelul teoretic, să participe la ședințe, sesiuni, comunicări, iar în unitățile lor să se organizeze la două săptămîni ședințe de referate. Standardizarea să se facă cu mult discernămînt iar rezultatele să fie redactate în mod uniform.

A. Anghel (Lab. bioch., Spit. boli contagioase „Prof. dr. V. Babeș", București) a arătat utilitatea simpozionului, importanța organizării unor laboratoare centralizate și necesitatea introducerii izotopilor radioactivi și a unor serii de determinări noi. A cerut ca lucrările simpozionului să fie popularizate de către participanți, iar cele mai valoroase lucrări să fie publicate după o prealabilă verificare. Să fie alcătuit un manual cu date cît mai controlate.

Prof. Maria Franke (Iași) a arătat aportul deosebit pe care-l aduce explorarea chimică în clinică și necesitatea prezenței chimistului lîngă medic, la patul bolnavului. În continuare, vorbitoarea a scos în evidență valoroasa contribuție practică pe care a adus-o simpozionul și a cerut să se ia în considerație problema determinărilor imunologice în laboratorul clinic.

S. Elias (Timişoara) a făcut propuneri privind criteriile de alegere a metodelor standard. Aceste metode să necesite aparatură şi substanţe accesibile, să aibe o durată mică şi să nu necesite probe paralele. În general, ar fi necesară standardizarea a cîte două tehnici pentru o determinare, una foarte simplă, de orientare, şi alta mai fină, de precizie. În ceea ce priveşte colaborarea cu clinica, biochimistul nu trebuie copleşit cu analize de rutină, pentru a-i rămîne timp să se documenteze.

B. Nestorescu (Bucureşti) a făcut sugestii asupra sarcinilor comisiei ce va trage concluziile simpozionului. Rezultatele muncii acestei comisii să fie difuzate prin fascicule periodice, mai operative decît un tratat. În continuare, vorbitorul a indicat o serie de aparate ce ar putea fi construite în ţară.

Th. Porsche (Timişoara) şi-a exprimat mulţumirea pentru faptul că s-a organizat simpozionul, făcînd aprecieri generale asupra lucrărilor prezentate. A sugerat să se înfiinţeze un centru metodologic, cu caracter oficial, eventual un institut de laborator clinic. Ar fi necesară de asemenea, mărirea numărului cadrelor medii tehnice, pentru a se lăsa cadrelor cu pregătire superioară timpul necesar pentru ridicarea nivelului ştiinţific. Trebuie alese cu grijă metodele pentru standardizare. Este necesară apariţia unei reviste de laborator clinic. Cei mai indicaţi pentru lucru în laboratorul clinic sînt absolvenţii facultăţii de chimie. În încheiere, a cerut să se acorde mai multă consideraţie pentru cadrele de laborator.

Gh. Haralambie (Bucureşti) nu este de părere că reacţia Ayala este cea mai potrivită pentru dozarea acidului sialic. Propune varianta Seifer-Gurstenfeld. Glucidograma este de fapt sialicacidograma ; lucrările recente arată că pentru reacţia P.A.S. ar fi responsabile grupările glicol ale acidului sialic şi nu hexozele. Pentru alcaloizi propune metoda Delaville, rapidă şi simplă. Cere publicarea celor mai importante comunicări din cadrul simpozionului.

S. Comoroşan (Bucureşti) arată că pentru alegerea metodelor în vederea standardizării, este mai operativ să se apeleze la cîţiva specialişti, decît să se alcătuiască prea multe colective. Să se recunoască biochimia medicală ca o specialitate a medicinei. Să se afecteze biochimistului suficient personal ajutător, pentru a-i lăsa timp de documentare.

E. Dragu propune să se facă întîi standardizarea unui număr limitat de metode. Să apară o gazetă medicală, avînd rezervat un spaţiu important pentru laboratorul clinic.

F. Midan sugerează ca standardizarea să se facă pe etape, mai întîi într-un raion din Capitală. Să apară caiete periodice cu metodele de laborator. Tehnicile standard să fie puse la punct şi verificate întîi în laboratoare şi apoi să fie supuse comisiei. Tratatele ce se publică să se ocupe mai mult cu partea practică de laborator.

G. Florovici (Craiova), în legătură cu sursele de erori în analiza biochimică, arată că tratamentele cu antibiotice şi dibutamid fac să se obţină rezultate mărite la determinarea ureei sanguine.

În încheiere a luat cuvîntul *acad. prof. E. Macovschi*, care a mulţumit M.S.P.S. şi U.S.S.M. pentru sprijinul acordat organizării acestui simpozion, în cadrul căruia s-au întîlnit pentru prima oară chimiştii din clinicile diferitelor centre din ţară. De asemenea, a mulţumit şi celor care prin referate, comunicări şi participare la discuţii au contribuit la bunul mers al lucrărilor.

În continuare, vorbitorul a arătat că unele deficienţe inerente începutului se vor elimina pe viitor, întrucît astfel de simpozioane, pe diferite teme, se vor repeta periodic.

În încheiere a prezentat proiectul de propuneri, completat pe baza sugestiilor făcute de cei care au luat parte la discuţii. Acest proiect arată necesitatea imperioasă a coordonării şi modernizării metodelor de biochimie din laboratoarele clinice şi lipsa unui for metodologic coordonator. Laboratoarele clinice trebuie orientate spre practicarea metodelor moderne de analiză, o dată cu asigurarea unei baze materiale corespunzătoare. Ţinîndu-se seama de sarcinile trasate de al III-lea Congres P.M.R., de perspectivele de dezvoltare pe care le are biochimia şi de aportul pe care aceasta poate să-l aducă la dezvoltarea medicinei pe baze ştiinţifice, simpozionul propune :

a) Standardizarea unui număr strict necesar de tehnici, în funcţie de aparatura corespunzătoare, pentru toate laboratoarele de biochimie medicală. Pentru început să se facă o standardizare experimentală, într-un raion din Capitală, pe etape. Acest experiment să fie analizat în cadrul şedinţelor U.S.S.M. şi comunicat M.S.P.S. pentru definitivare.

b) Metodele cele mai raţionale care au fost prezentate cu ocazia simpozionului să fie litografiate şi difuzate, iar fiecare laborator să-şi alcătuiască şi să ţină la zi fişe metodologice.

c) Pe lîngă metodele clinice de investigaţie, să se acorde o atenţie mai mare metodelor fizico-chimice moderne, precum şi utilizării de micrometode.

d) Ţinîndu-se seama de avîntul pe care-l cunoaşte industrializarea socialistă a ţării noastre, să se ia în studiu construirea unei aparaturi strict necesare, la nivelul tehnicii mondiale, care să deservească cerinţele legate de ocrotirea sănătăţii oamenilor muncii.

e) Este absolut necesară înfiinţarea unei reviste medicale pentru „Laboratorul clinic", unde biochimia să aibe asigurat spaţiul necesar.

f) Se remarcă o aprofundare a cercetărilor legate de diagnostic, pe baza studierii structurilor subcelulare şi a factorilor fizico-chimici şi enzimatici care stau la baza metabolismului celular normal şi patologic. Rezultatele acestor cercetări vor contribui la depistarea în condiţii tot mai bune a maladiilor în faza lor moleculară, incipientă, cînd şansele de terapie sînt mult sporite.

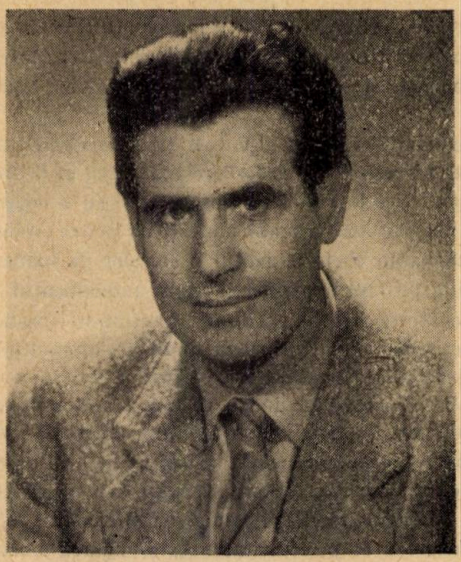
g) Reglementarea unei specializări pe lîngă una din facultăţile de medicină generală, prin care să fie trecuţi toţi cei care sînt repartizaţi pentru nevoile acestor laboratoare. Acest personal va face practica efectiv în laboratoarele unităţilor mari spitaliceşti.

h) O mai strînsă colaborare între chimişti, biochimişti, fizicieni, biofizicieni, fiziologi şi medici.

i) O reglementare a situaţiei tuturor cadrelor care lucrează în domeniul biochimiei analitice medicale, din punct de vedere al încadrării şi salarizării, prin recunoaşterea acestei specialităţi în nomenclatorul Ministerului Sănătăţii şi Prevederilor Sociale.

Participanţii la simpozion au aprobat în unanimitate proiectul de propuneri.

D. Moţet-Grigoraş
Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.



CORNEL GURBAN
1927—1963

Cornel Gurban s-a stins din viaţă la 10 octombrie 1963. S-a născut la 25 aprilie 1927 la Lipova, regiunea Banat. După terminarea liceului din localitatea natală a urmat cursurile Academiei comerciale şi industriale din Braşov, manifestînd o preocupare deosebită pentru chimie. Pe cînd era încă student la Braşov, s-a înscris la Facultatea de chimie din Bucureşti şi a absolvit cursurile Secţiei de biochimie în 1954. După terminarea studiilor, a fost preparator, şef de laborator şi apoi asistent la Catedra de chimie biologică de la Institutul de cultură fizică şi apoi la Catedra de chimie biologică de la Facultatea de medicină.

C. Gurban a iubit munca didactică. A ştiut să cîştige încrederea şi aprecierea studenţilor, prin preocuparea sinceră de a le insufla respect şi dragoste faţă de muncă şi faţă de om.

C. Gurban a iubit cu pasiune munca de cercetare ştiinţifică, pentru care era dotat excepţional. Poseda atît inteligenţa necesară spre a sesiza esenţa problemelor investigate, cît şi capacitatea de a le urmări cu stăruinţă şi pasiune pînă la cele mai mici amănunte, fără să creadă vreodată că ar fi ajuns la limita posibilităţilor de informare ştiinţifică sau de experimentare.

Activitatea ştiinţifică şi-a început-o sub îndrumarea conf. dr. N. Şanta, în laboratorul de fiziologie de la Facultatea de ştiinţe naturale, unde a lucrat benevol în anii 1954—1957. În acest laborator a efectuat interesante cercetări experimentale asupra unor muşchi netezi. Aceste cercetări, efectuate cu o excepţională răbdare şi migală, au pus în evidenţă un efect necunoscut, paradoxal al acţiunii unor excitanţi electrici asupra musculaturii netede a stomacului de broască. În anumite condiţii de faradizare a acestor preparate, se obţine în locul unei reacţii motoare pozitive, un răspuns cu totul opus, reprezentat printr-o inhibiţie a activităţii automate şi a reactivităţii lor faţă de diferiţi alţi excitanţi. Efectul paradoxal al faradizării se datoreşte mobilizării şi intervenţiei componentei nervoase simpatice, prezentă în structura musculaturii sto-

macului. S-a mai demonstrat și faptul că procesele metabolice aerobe sînt necesare atît pentru efectuarea activității automate și a reactivității musculaturii netede, cît și pentru întreținerea activității componentelor nervoase vegetative intramurale. Rezultatele acestor cercetări reprezintă o prețioasă contribuție la elucidarea comportării motoare a organelor viscerale cu musculatură netedă.

În Laboratorul de chimie biologică al Facultății de medicină, C. Gurban a efectuat cercetări privind mecanismul proceselor de fosforilare oxidativă și de control metabolic, la nivel celular. Înarmat cu o pregătire teoretică remarcabilă și cu o deosebită abilitate de experimentator, C. Gurban a abordat aceste probleme într-un punct esențial : eficiența energetică a oxidării succinatului, substanța cheie în lanțul proceselor de oxidare celulară. De la început cercetările lui au semnalat un fapt experimental nou : randamentul energetic al oxidării fosforilante a succinatului depășește valorile găsite în literatura de specialitate. Sesizînd importanța teoretică a acestui fapt experimental, C. Gurban a adîncit sub multiple aspecte problema, descoperind și studiind apoi prin metode cantitative, efectul pe care îl exercită asupra valorii citului de fosforilare ATP-ul, substratul, hexochinaza și timpul de incubare. S-a dovedit că la începutul fosforilării fosfatul anorganic este captat de mitocondrii cu o viteză ridicată, apoi viteza esterificării fosfatului scade și rămîne constantă. Cercetările lui C. Gurban consacrate studiului respirației mitocondriale au atras atenția asupra unui fenomen de periodicitate în viteza de oxidare a succinatului. Oscilațiile în viteza respirației mitocondriale sînt probabil determinate și controlate de acest fenomen de periodicitate. Aprofundarea cercetărilor în această direcție are perspectiva de a arunca o lumină nouă asupra mecanismului reglării metabolice a vitezei reacțiilor din ciclul acizilor tricarboxilici.

Moartea l-a surprins în plin proces de desăvîrșire a ideilor sale științifice, cînd începuse deja să culeagă rodul anilor de muncă perseverentă. Rămas pînă în ultima clipă la masa sa de lucru, C. Gurban reprezintă, pentru toți cei ce l-au cunoscut, un simbol de modestie și dragoste curată pentru știință.

LISTA LUCRĂRILOR

1. *Observațiuni asupra eliminării renale a fosfaților minerali, albuminei și pH-ului urinar la schiorii fondiști*, Institutul de Cultură Fizică, Culegere de comunicări științifice, 1957, p. 173.
2. *Clearance hepatic cu bromsulfonftaleină în afecțiunile hepatice* (în colaborare cu *I. Mincu*), Medicină internă, **12**, *6*, 889 (1960).
3. *Comportarea complexului mio-neural al stomacului izolat de broască față de unii excitanți electrici* (în colaborare cu *N. Șanta*), Studii și cercetări de biologie animală, **12**, *3*, 297 (1960).
4. *Influența componentei nervoase simpatice asupra motilității viscerale* (în colaborare cu *N. Șanta*), Comunicări de zoologie, Societatea de științe naturale și geografie, 1960, p. 55.
5. *Rolul proceselor metabolice aerobe în fiziologia mușchilor netezi* (în colaborare cu *N. Șanta*), Studii și cercetări de biologie animală, **13**, *3*, 371 (1961) ; și în Revue de Biologie, **6**, *1*, 61 (1961).
6. *Observații asupra citului de fosforilare în mitocondriile din ficatul de șobolan în sistemul oxidativ al succinatului* (în colaborare cu *Elena Cristea*), Studii și cercetări de biochimie, **4**, *4*, 551 (1961).
7. *Influența decuplanților, a inhibitorilor transportului de electroni și a concentrației substratului asupra citului de fosforilare cu succinat* (în colaborare cu *Elena Cristea*), Studii și cercetări de biochimie, **5**, *3*, 415 (1962).
8. *Influența timpului de incubare asupra valorii citului de fosforilare cu succinat* (în colaborare cu *Elena Cristea*), Studii și cercetări de biochimie, **5**, *3*, 423 (1962).

9. *„Enzimologia și histoenzimologia rinichiului de șoc"* în Th. Burghele și E. W. Rugendorff — *„Rinichiul de șoc"*, Editura Academiei R.P.R., 1962, p. 171—213.
10. *Aspecte noi ale oxidării fosforilante a succinatului în mitocondriile din ficat de șobolan* (în colaborare cu *Elena Cristea*), Lucrările sesiunii științifice de Chimie, Cluj, 1962 (sub tipar).
11. *Factori de control ai sintezei oxidării succinatului în mitocondriile din ficat de șobolan* (în colaborare cu *Elena Cristea* și *Ileana Mitu*), Studii și cercetări de biochimie, **6**, *4*, 548 (1963).
12. *Aspecte radiomicroangiografice, histochimice și enzimatice ale rinichiului în sarcină* (în colaborare cu *Th. Burghele, E. W. Rugendorff* și *Viorica Mareș*), Lucrările Congresului de nefrologie, Praga,1963 (sub tipar).
13. *Efectul fluorurii și al concentrației adenozintrifosfatului asupra vitezei și eficienței fosforilării oxidative în mitocondrii* (în coaborare cu *Elena Cristea*), studii și cercetări de biochimie, **7**, *1*,57 (1964).

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

IONEL HAIDUC, *Introducere în chimia ciclurilor anorganice*, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIȚESCU, I. P. CANTUNIARI și I. G. DINULESCU, *Nomenclatura chimiei organice*, 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, *Enzimele*, 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ și N. I. IONESCU, *Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie*, 180 p., 9,90 lei.

C. C. OPRESCU, *Infecția cu micobacterii*, 224 p. + 5 pl., 12,20 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN și N. CARP, *Histochimia mucopolizaharidelor*, 284 p. + 24 pl., 20 lei.

LUCRĂRI ÎN CURS DE APARIȚIE ÎN EDITURA ACADEMIEI R.P.R.

C. BODEA și COLAB., *Tratat de biochimie vegetală*, vol. I.

ERATĂ

Pag.	rîndul:	în loc de:	se va citi:	din vina:
49	17	$\eta_{rel.} = \frac{t\,suc}{t\,apă} \cdot \frac{d\,apă}{d\,suc}$	$\eta_{rel.} = \frac{t\,suc}{t\,apă} \cdot \frac{d\,suc}{d\,apă}$	autorilor
112	Figurile 3 și 4 sînt inversate între ele			editurii

Studii și Cercetări de Biochimie 1/1964

Revista apare de 3 ori pe an.

Prețul unui abonament este de 36 lei

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se fac prin:

CARTIMEX

Căsuța poștală 134—135

București

R. P. Romînă sau prin

reprezentanții săi din străinătate.

c. 5439 I. P. „Informația"

43816

Lei 12.

E 1330

studii şi cercetări de

biochimie

2

TOMUL 7
1964

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
St. cerc. biochimie, tomul 7, nr. 2, p. 147—312, Bucureşti, iunie 1964

COMITETUL DE REDACȚIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN EUG. MACOVSCHI,

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUȘANSCHI,

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU,

Secretar de redacție,

CECILIA ȘELARU

Revista apare de 3 ori pe an.

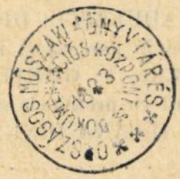
Prețul unui abonament este de 36 lei.

În țară abonamentele se fac la oficiile poștale, agențiile poștale, factorii poștali și difuzorii voluntari din întreprinderi și instituții.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuța poștală 134 — 135, București, R. P. Romînă, sau prin reprezentanții săi din străinătate.

Manuscrisele, cărțile și revistele pentru schimb, precum și orice corespondență, se vor trimite comitetului de redacție pe adresa:

București, *Str. Popovici nr. 20*
Raionul 30 Decembrie
Tel. 18.43.55—17.79.63



STUDII ŞI CERCETĂRI DE BIOCHIMIE

Tomul 7, nr. 2 1964

SUMAR

	Pag.
Editorial	149
E. MACOVSCHI, MIOARA CÂRSTEANU, ALEXANDRINA POPESCU, Metodă pentru determinarea exosmozei electroliţilor din colul uterin	151
EUGEN A. PORA, ALEX. ABRAHAM, NINA ŞILDAN, Acţiunea derivaţilor progesteronei asupra acizilor nucleici din timus şi splină	155
C. T. NICOLAU, V. BRATU, P. TEITEL, Utilizarea fierului radioactiv în studiul tipurilor genetice de siderofilină	161
L. M. BURUIANĂ, EL. HADARAG, I. BĂRBULESCU, Calitatea proteinelor plasmei seminale	165
ELENA CRISTEA, Studiul condiţiilor în care oxalacetatul inhibă oxidarea succinatului de către mitocondrii	173
STELA GHEŢIE, EMILIA TRIPCOVICI, Dozarea glucidelor în lichidele biologice prin reacţia cu *o*-toluidină	183
S. GOGĂLNICEANU, A. CIOFU, R. CHIRILĂ, Microdozare de iod în plante	191
CORINA IORDACHE, Rolul excitaţiilor şi efortului mecanic în descompunerea fosfagenului din muşchi în diferite stări de excitabilitate	195
M. KEREKES, Contribuţii la studiul tripsinolizei proteinelor globulare denaturate prin căldură	205
V. V. MICUŞAN, LUCIA BUZILĂ, Relaţii de antigenitate între proteinele serice materne, imunoglobulinele colostrale şi proteinele serice ale nounăscutului la bovine	213
D. MOŢET, V. GHEŢIE, Electroforeza preparativă în gel de agaroză	221

Pag.

EUG. PĂUNESCU, ECATERINA HADÎRCĂ, Reactivitatea biochimică şi imunologică a macrofagului histioid în tuberculoză. I. Activitatea dehidrogenazică şi fosfatazică 229

TRAIAN RĂDULESCU, LORA SCOLNIC, Exosmoza fosfatului anorganic în diferite stări funcţionale ale muşchiului 237

TRAIAN RĂDULESCU, DITA COTARIU, Exosmoza fosfatului anorganic din muşchi în narcoză şi mişcare pasivă 243

H. D. SCHELL, V. GHEŢIE, Cuplarea clorurii de *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonil cu proteinele serice şi purificarea conjugatelor obţinute 249

A. SPORN, ILEANA DINU, Studii enzimatice în intoxicaţia experimentală cu arsen 257

MIHAIL ŞERBAN, Polarografia proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie . . 267

ADELA ŞTEFAN, Acţiunea parationului asupra fosforului total, substanţelor reducătoare şi consumului de oxigen din seminţele, frunzele şi rădăcinile sfeclei de zahăr 279

D. TĂNĂSESCU, Acizii lactic şi piruvic din muşchii gastrocnemieni de broască în contracţia izotonică 285

MARCELA ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, C. VLĂDESCU, ILEANA APOSTOLESCU, MARIANA GOCIU, C. MIRON, Cuprooxidaza serică în cursul unor afecţiuni inflamatorii cronice şi unor hemopatii maligne 295

RECENZII 301

NECROLOG 305

St. cerc. biochimie, tomul 7, nr. 2, p. 147—312, Bucureşti, iunie 1964

23 AUGUST 1944—23 AUGUST 1964

Profundele transformări înnoitoare petrecute după eliberarea patriei noastre la 23 August 1944, consolidarea orînduirii socialiste sub conducerea P.M.R., au deschis orizonturi noi de dezvoltare și propășire a științei în Republica Populară Romînă. Condițiile optime create în cei 20 de ani de existență a puterii populare au determinat progrese importante pe toate fronturile științei și au contribuit la afirmarea și creșterea prestigiului științei românești.

În aceste condiții, a devenit posibilă și dezvoltarea biochimiei în țara noastră. Înființarea unui institut de biochimie al Academiei R.P.R., organizarea de laboratoare de biochimie în diferite alte institute, extinderea catedrelor de biochimie în învățămîntul superior, precum și concentrarea unui număr de specialiști în diferite laboratoare din țară au creat premisele unei dezvoltări continue a cercetărilor de biochimie. Organizarea și planificarea acestor cercetări, abordarea unor probleme fundamentale ale biochimiei contemporane, orientarea spre rezolvarea unor aspecte cu caracter aplicativ, contribuie de asemenea la lichidarea rămînerii în urmă, moștenită din perioada antebelică, și la promovarea cercetărilor de biochimie din țara noastră. În acești ani s-au format numeroase cadre tinere care și-au ridicat calificarea lor profesională și științifică, iar baza materială a cercetării, ca și posibilitățile de documentare științifică în specialitate au crescut necontenit.

Datorită dezvoltării cercetărilor, a luat ființă prima revistă românească de biochimie, care urmărește să facă cunoscute în țară și străinătate lucrările originale elaborate atît în Institutul de biochimie din București, cît și în alte centre și laboratoare de cercetare științifică.

La a XX-a aniversare a eliberării patriei, cercetătorii care lucrează în domeniul biochimiei își exprimă profundul lor atașament pentru Partidul Muncitoresc Romîn, contribuind prin munca lor la progresul științei românești, pusă în slujba desăvîrșirii construcției socialiste.

COMITETUL DE REDACȚIE

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 151–154, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

METODĂ PENTRU DETERMINAREA EXOSMOZEI ELECTROLIȚILOR DIN COLUL UTERIN

DE

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI, MIOARA CÂRSTEANU și ALEXANDRINA POPESCU

Rezumat. — Se descrie o metodă conductimetrică comodă pentru determinarea *in situ* a exosmozei electroliților din exocolul uterin. Se constată că, în unele stări patologice ale colului (eroziuni, cervicite), și în special în cancerul de col, exosmoza electroliților din exocol este crescută față de normal.

În lucrări anterioare a fost descrisă o metodă conductimetrică de măsurare a exosmozei electroliților din piele, metodă care permite efectuarea cercetărilor *in situ*, în condiții de structură intactă a materialului biologic viu; s-a determinat intensitatea exosmozei electroliților din pielea umană, în stare normală și patologică, constatîndu-se că valorile care se obțin pot servi nu numai pentru controlul diagnosticului, dar și pentru urmărirea atît a evoluției diferitelor boli ale pielii, cît și a efectului tratamentului aplicat [1], [2].

Rezultatele obținute justificau extinderea cercetărilor asupra mucoasei exocolului uterin, datorită atît frecvenței cancerului și altor maladii care apar la acest nivel, cît și condițiilor deosebit de prielnice pentru manifestarea fenomenului de exosmoză. În adevăr, dat fiind că epiteliul exocolului uterin, spre deosebire de epiderm, nu are un strat cornos cheratinizat care să îngreuieze exosmoza electroliților din țesut, era de așteptat ca modificările permeabilității și echilibrului electroliților din țesut, frecvente în diferite stări patologice ale colului, să fie însoțite de modificări ale exosmozei, devenind astfel sesizabile prin măsurarea acesteia.

Pentru măsurarea exosmozei electroliților am aplicat, cu unele modificări, aceeași metodă pe care am folosit-o la cercetarea endosmozei iodului în exocolul uterin [3], [4], tehnica de lucru fiind următoarea:

Pe colul uterin, spălat în prealabil cu apă distilată pentru eliminarea eventualelor secreții și uscat cu un curent de aer, se aplică un tub de sticlă deschis la ambele capete, lung de 20 cm și cu diametrul interior de 3 cm; o ușoară apăsare asigură etanșeitatea legăturii. Apoi se introduc în tub 10,0 ml apă bidistilată, cu conductibilitatea electrică specifică de ordinul $20.10^{-7}\ \Omega^{-1}$.

De îndată ce mucoasa exocolului vine în contact cu apa, începe exosmoza electroliților din exocol. Este de remarcat că procesul exosmozei nu este practic influențat de creșterea

progresivă a concentraţiei electroliţilor în apă, deoarece cantitatea electroliţilor care ies din exocol este foarte mică, iar curenţii de convecţie care se produc datorită diferenţelor de temperatură dintre exocol şi apă asigură primenirea continuă a stratului de apă ce vine în contact cu mucoasa exocolului. După 10 min de la introducerea apei în tub, printr-o uşoară înclinare a tubului se trece apa într-un pahar Berzelius şi se măsoară conductibilitatea ei electrică specifică. În acest scop, am folosit un conductoscop cehoslovac şi o celulă conductometrică de tip Arrhenius cu electrozi discoidali de platină cu diametrul de 1 cm, aşezaţi la distanţă de aproximativ 3 mm. Această celulă avea constanta de 0,0475 şi permitea măsurarea conductibilităţii specifice pe 5 ml lichid. Determinările le-am efectuat la 25°C (ultratermostat Höppler), iar conductibilitatea specifică am calculat-o după formula cunoscută

$$\lambda = \frac{K}{R \cdot n} - \lambda_a$$

în care : K reprezintă constanta celulei, R — rezistenţa din circuit în ohmi, n — indicaţia de pe scala conductometrului, iar λ_a — conductibilitatea electrică specifică a apei bidistilate.

Cu cît exosmoza electroliţilor din exocolul uterin este mai intensă, cu atît conductibilitatea specifică a apei devine mai mare. Înseamnă că valorile conductibilităţii specifice, calculate după formula de mai sus, pot servi direct la aprecierea intensităţii exosmozei, rezultatele fiind comparabile între ele dacă în toate determinările se folosesc tuburi de acelaşi diametru (3 cm) — care asigură aceeaşi suprafaţă de contact între apă şi exocol —, dacă în tuburi se introduce aceeaşi cantitate de apă bidistilată (10,0 ml) şi dacă timpul de contact între apă şi exocol este totdeauna acelaşi (10 min).

Cu ajutorul metodei descrise s-a constatat că, în conformitate cu aşteptările, exosmoza electroliţilor din exocolul uterin este cam de 10 ori mai intensă decît exosmoza electroliţilor din piele. Apoi s-a stabilit că valorile conductibilităţii specifice obţinute în cazul exosmozei electroliţilor din exocoluri normale sînt cuprinse între $500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ şi $2500.10^{-7}\ \Omega^{-1}$, marea lor majoritate variind între $1000.10^{-7}\ \Omega^{-1}$ şi $2000.10^{-7}\ \Omega^{-1}$. În cazuri patologice (de ex. la eroziuni şi cervicite), exosmoza creşte apreciabil, conductibilitatea specifică ajungînd pînă la $4000.10^{-7}\ \Omega^{-1}$. Valori deosebit de ridicate s-au constatat în cazuri de cancer (pînă la $20\,000.10^{-7}\ \Omega^{-1}$), exosmoza electroliţilor fiind aici cu atît mai intensă cu cît boala este mai avansată.

Aceste date preliminare arată că metoda preconizată are perspective de utilizare în laboratorul clinic, permiţînd investigarea rapidă şi comodă a stării exocolului uterin *in situ* şi în condiţii de structură intactă, ceea ce poate prezenta interes nu numai pentru diagnostic, dar şi pentru urmărirea evoluţiei diferitelor maladii care afectează colul uterin, precum şi pentru cercetări privind efectul tratamentului aplicat. Un alt avantaj al acestei metode constă în faptul că, spre deosebire de unele metode histologice şi enzimologice curente [5], [6], [7], ea nu necesită biopsie.

Lucrarea a fost efectuată în colaborare cu Maternitatea Filantropia din Bucureşti.

Prezentată la redacţie
la 25 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. Macovschi. S. Comoroșan, *Cercetări conductimetrice asupra electroliților din piele*, St. cerc. biochimie, *3—4*, 271 (1956).
2. E. Macovschi, S. Comoroșan, *Konduktometrische Untersuchungen der Elektrolytexosmose aus der Haut*, Ärztliche Forschung, **12**, *5*, 2 (1958).
3. E. Macovschi, A. Mihăescu, A. Popescu, *Procedeu pentru măsurarea endosmozei iodului în colul uterin*, St. cerc. biochimie, *1*, 113 (1962).
4. A. Popescu, A. Mihăescu, *Variațiile valorilor endosmozei iodului în colul uterin patologic* (sub tipar).
5. A. Popescu, A. Mihăescu, *Variațiile valorilor endosmozei iodului în colul uterin normal* (sub tipar).
6. L. D. Odell, J. Burt, R. Bethea, *Glucuronidaze activity*, Science, **109**, 564 (1949).
7. W. H. Fishman, B. Springer, R. Brunetti, *Application of an improved glucuronidaze assay method to the study of human blood*, J. Biol. Chem., **173**, 449 (1948).
8. A. Limburg, *Die Fruhdiagnose des Uteruscarcinoms*, Stuttgart, G. Thieme Verlag, 272 (1956).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, p. 155–160, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

ACȚIUNEA DERIVAȚILOR PROGESTERONEI ASUPRA ACIZILOR NUCLEICI DIN TIMUS ȘI SPLINĂ

DE

ACADEMICIAN EUGEN A. PORA, ALEX. ABRAHAM și NINA ȘILDAN

Rezumat. — Autorii au urmărit acțiunea unor derivați naturali și sintetici ai progesteronei asupra cantității de acizi nucleici totali ai timusului și splinei șobolanilor albi femele (100 ± 10 g greutate). Dozarea acizilor nucleici s-a făcut după metoda spectrofotometrică diferențială a lui Spirin. În urma tratamentului (doză totală : 25 mg/100 g corp, timp de 3 zile), s-a observat scăderea considerabilă a greutății organelor și a acizilor nucleici din timus și splină, în cazul acetatului de hidrocortizon, *21*-acetoxiprogesteronei, progesteronei, *4*-clorprogesteronei și Δ^5-pregnen-*3*-β-ol-*20*-onei. Prin tratament cu pregnan-*3*-α, *6*-α-diol-*20*-ona și *4*, *5*-epoxiprogesterona nu s-au obținut modificări paralele.

Este bine cunoscut faptul că, în urma unui tratament cronic cu hormoni corticosteroizi sau sexuali, se produce o involuție a timusului [1—4]. Rezultatele măsurării activității timolitice obținute în cazul tratamentului cu *11*-oxicorticosteroizi au stat chiar la baza unor metode de dozare biologică a activității extractelor adrenocorticale [5]. La șobolani normali s-a stabilit o relație între doza de progesteronă administrată și greutatea timusului, raportată la 100 g corp [6].

Cercetările recente au dovedit că hormonii corticosteroizi au efecte și asupra metabolismului acizilor nucleici din țesuturile animale, fapt constatat pentru prima dată de Selye în 1936 [1]. Aceste rezultate indică modificări în metabolismul celular, care se manifestă și în morfologia nucleului celular (dezintegrarea structurală a nucleului celular).

Clark și Stoerk [7], studiind metabolismul fosforului radioactiv (P^{32}) din acidul dezoxiribonucleic al timusului și ganglionilor limfatici, au găsit că hidrocortizonul inhibă sinteza acidului dezoxiribonucleic în ganglioni și, în măsură mai mică, în timus. Cseh și colab. [8] au constatat că hidrocortizonul mărește activitatea dezoxiribonucleazică a timusului atît *in vivo*, cît și *in vitro*, iar *11*-dezoxicorticosteronul inhibă activitatea dezoxiribonucleazică numai *in vivo*. Modificarea activității dezoxiribonu-

cleazice a timusului, splinei şi a ganglionilor limfatici este asociată cu variaţia conţinutului lor în acid dezoxiribonucleic.

Pe baza acestor rezultate am pornit de la ipoteza că modificarea conţinutului de acizi nucleici al organelor limfatice, prin tratament cu hormoni steroizi, este în strînsă legătură cu structura lor chimică. Am urmărit acţiunea unor derivaţi naturali şi sintetici ai progesteronei asupra conţinutului acizilor nucleici totali din timusul şi splina şobolanilor.

MATERIAL ŞI METODĂ

A. Tratamentul animalelor în experiment: şobolani albi, femele, cu greutate de 100 ± 10 g, au fost trataţi cu următoarele substanţe, în doză totală de 25 mg pe 100 g corp:

1) *11*-β, *17*-α-dihidroxi-*21*-acetoxiprogesteronă (Hidrocortizon CIF).
2) *21*-acetoxiprogesteronă (DOCA).
3) Progesteronă (Sintex, Mexico).
4) *4*-clorprogesteronă.
5) *4, 5*-epoxiprogesteronă.
6) Δ^5-pregnen-*3*-β-ol-20-onă.
7) Pregnan-*3*-α, 6-α-diol-20-onă.
8) Colesterol (E. Merck).

Injecţii subcutanate au fost administrate timp de 3 zile, în formă de suspensie uleioasă, în regiunea dorsală. Martorii au fost trataţi cu un volum egal de ulei. După tratament, animalele au fost sacrificate, iar timusul şi splina au fost scoase imediat şi spălate cu apă bidistilată, îndepărtîndu-se sîngele şi ţesuturile conjunctive. Cîntărirea organelor s-a făcut la balanţa de torsiune.

B. Dozarea acizilor nucleici totali prin metoda spectrofotometrică diferenţială a lui Spirin [9]. Organele au fost mojarate şi omogenizate în omogenizator de sticlă tip Potter, cu soluţie de $HClO_4$ 0,2 N, răcit la +4°C, şi apoi centrifugate timp de 30 min la 6 000 ture pe min. Sedimentul a fost spălat cu soluţie de $HClO_4$ 0,2 N şi centrifugat din nou. Supernatantele au fost decantate iar sedimentul a fost hidrolizat în soluţie de $HClO_4$ 0,5 N la 90°C, timp de 20 min. După filtrarea hidrolizatelor, soluţiile perfect transparente au fost spectrofotometrate la 270 mμ şi 290 mμ lungime de undă faţă de $HClO_4$ 0,5 N, cu spectrofotometrul Zeiss VSU-1.

REZULTATE

Acetatul de hidrocortizon, administrat animalelor în doze mari, provoacă involuţia timusului (a cărui greutate scade de la 1,58 ± 0,47 la 0,60 ± 0,28 mg/g greutate) şi a splinei (de la 5,12 ± 0,85 la 3,13 ± 0,99 mg/g greutate), constatîndu-se şi scăderea considerabilă a acizilor nucleici totali (tabela nr. 1).

4,5-Epoxiprogesterona, *4*-clorprogesterona, Δ^5-pregnen-3-β-ol-20-ona, *21*-acetoxiprogesterona şi progesterona acţionează în acelaşi sens cu acetatul de hidrocortizon, dar au un efect mai slab asupra scăderii cantităţii

Tabela nr. 1

Acțiunea derivaților progesteronei asupra cantității acizilor nucleici din timus și splină

Denumirea substanței	Nr. animalelor experimentate	TIMUS				SPLINĂ			
		Acizi nucleici totali mg/g ± E.S.*	t	P	±% față de martor	Acizi nucleici totali mg/g ± E.S.	t	P	±% față de martor
Martori	14	27,404±1,017	—	—	—	17,526±0,475	—	—	—
11-β, *17*-α-Dihidroxi-*21*-acetoxi-progesteronă (acetat de hidrocortizon)	8	6,913±0,493	18,1	<0,01	−74,8	5,126±0,499	24,8	<0,01	−70,8
21-Acetoxiprogesteronă	8	23,241±1,250	2,58	>0,01 <0,02	−15,2	14,156±1,885	4,12	<0,01	−19,2
Progesteronă	15	23,285±1,843	1,95	0,06	−15,1	16,641±0,357	0,79	>0,2 <0,5	−5,0
4-Clorprogesteronă	11	17,832±1,111	6,4	<0,01	−34,3	15,143±1,273	1,95	0,06	−13,5
4, *5*-Epoxiprogesteronă	8	13,586±0,492	10,8	<0,01	−50,2	12,272±0,379	8,5	<0,01	−29,9
Δ^5-Pregnen-*3*-β-ol-*20*-onă	8	19,227±1,213	5,20	<0,01	−29,9	13,050±0,556	8,35	<0,01	−25,5
Pregnan-*3*-α, *6*-α-diol-*20*-onă	8	31,768±1,275	2,67	>0,01 <0,02	+11,5	16,860±0,751	1,18	>0,2 <0,5	−3,1
Colesterol	8	24,003±1,376	1,99	0,06	−12,5	14,363±2,832	2,85	<0,01	−18,0

* E. S.: eroare standard.

de acizi nucleici. În acelaşi timp *4,5*-epoxiprogesterona măreşte greutatea relativă a timusului şi splinei, atunci cînd e administrată în doza de

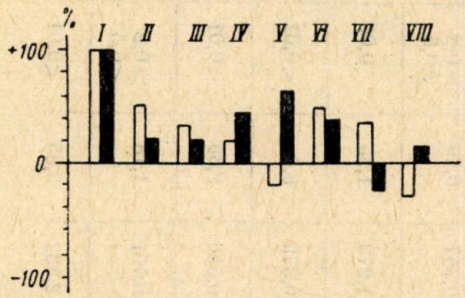


Fig. 1. — Variaţia procentuală a greutăţii relative a timusului (mg pe g greutate) (▭) şi a concentraţiei de acizi nucleici (■) din timus, ca urmare a tratamentului cu derivaţii progesteronei, comparativ cu activitatea acetatului de hidrocortizon (100%).

I. Acetat de hidrocortizon.
II. *21*-acetoxiprogesteronă.
III. Progesteronă.
IV. *4*-clorprogesteronă.
V. *4, 5*-epoxiprogesteronă.
VI. Δ^5-pregnen-*3*-β-ol-*20*-onă.
VII. Pregnan-3-α, *6*-α-diol-*20*-onă.
VIII. Colesterol.

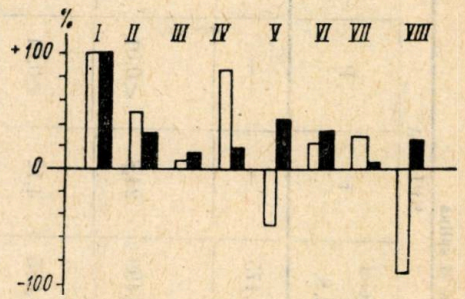


Fig. 2. — Variaţia procentuală a greutăţii relative a splinei (mg pe g greutate) (▭) şi a concentraţiei de acizi nucleici (▪) din splină, ca urmare a tratamentului cu derivaţii progesteronei, comparativ cu activitatea acetatului de hidrocortizon (100%).
(Legenda pentru substanţe este identică cu cea de la fig. 1).

25 mg/100 g greutate (fig. 1 şi 2). Pregnan-*3*-α, 6-α-diol-*20*-ona acţionează în sensul creşterii concentraţiei acizilor nucleici, dar în acelaşi timp greutatea timusului scade.

DISCUŢII

În urma cercetărilor recente se ştie că hormonii steroizi produc modificări însemnate în metabolismul organelor limfatice [4], [7], [8], [10]. Chiar rezultatele noastre arată că acţiunea diferitelor tipuri de substanţe din grupa hormonilor steroizi asupra timusului şi splinei nu este specifică. Numai glicocorticosteroizii au efect timolitic puternic şi specific, cu o relaţie precisă între doză şi efect. Nu s-a observat o acţiune specifică în cazul *4,5*-epoxiprogesteronei, pregnan-*3*-α, 6-α-diol-*20*-onei şi al colesterolului, însă toţi Δ^4-*3*-cetosteroizii folosiţi în experienţele noastre au prezentat o anumită acţiune timolitică; *11*-oxicorticosteroizii (hidrocortizonul şi cortizonul [4]) au un efect mai puternic, iar dezoxicorticosteroizii (*21*-acetoxiprogesterona, progesterona) şi *4*-clorprogesterona au efect mai redus, care se manifestă atît prin scăderea greutăţii relative a organelor, cît şi a cantităţii de acizi nucleici totali din timus.

Δ^5-Pregnen-*3*-β-ol-*20*-ona are o acțiune timolitică semnificativă, probabil din cauză că această substanță constituie un intermediar important în biosinteza hormonilor steroizi din organismul animal.

CONCLUZII

1) Δ^4-*3*-cetosteroizii (acetatul de hidrocortizon, *21*-acetoxiprogesterona, progesterona, *4*-clorprogesterona) și Δ^5-pregnen-*3*-β-ol-*20*-ona prezintă o acțiune involutivă asupra timusului și splinei care se manifestă atît prin reducerea ponderală a acestor glande, cît și prin scăderea cantității acizilor nucleici totali. Dintre aceste substanțe cea mai puternică acțiune o are acetatul de hidrocortizon.

2) *4,5*-Epoxiprogesterona, pregnan-*3*-α, 6-α-diol-*20*-ona și colesterolul nu au acțiune specifică asupra timusului și splinei, neputîndu-se stabili, în cadrul experiențelor noastre, o corelație între variația greutății relative a glandelor și a cantității acizilor nucleici.

3) Pe baza acestor rezultate se poate presupune că între structura chimică și acțiunea fiziologică a substanțelor steroidice folosite în experiențele noastre există anumite relații, care se manifestă și în modificarea metabolismului acizilor nucleici ai timusului și splinei.

Prezentată la redacție
la 10 octombrie 1963

Secția de fiziologie animală comparată,
Filiala Academiei R.P.R., Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. H. Selye, J. Exptl. Pathol., **17**, 234 (1936).
2. N. R. Stephenson, Canad. J. Biochem. Physiol., **34**, 253 (1956).
3. R. I. Dorfman, A. S. Dorfman, Endocrinology, **69**, 283 (1961).
4. E. A. Pora, V. Toma, I. Oros, A. Abraham, Rev. biol., **1**, 129 (1962).
5. R. I. Dorfman., *Methods in Hormone Research*, Acad. Press. Inc., New York—Londra, **II**, 355 (1962).
6. E. A. Pora, A. Abraham, V. Toma, J. Physiol., **55**, 320 (1963).
7. I. Clark, H. C. Stoerk, J. Biol. Chem., **222**, 285 (1956).
8. G. Cseh, I. Marosvári, Á. Harmath, Acta Physiol. (Hungar.), **XIV**, *2*, 115 (1958).
9. A. S. Spirin, Biohimiia, **32**, *5*, 656 (1958).
10. E. Z. Iusfina, Probl. endokrinol. i gormonoter., *5*, 110 (1961).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 161–164, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

UTILIZAREA FIERULUI RADIOACTIV ÎN STUDIUL TIPURILOR GENETICE DE SIDEROFILINĂ

DE

C. T. NICOLAU,
MEMBRU CORESPONDENT AL ACADEMIEI R.P.R.,

V. BRATU și P. TEITEL

Rezumat. — Saturarea cu fier radioactiv a serului, urmată de electroforeză pe hîrtie și autoradiografie, pun în evidență, în serul majorității persoanelor, o singură proteină capabilă să fixeze reversibil fierul, siderofilina beta$_1$-globulinică. Un număr relativ mic de persoane au în ser două siderofiline, care se deosebesc între ele prin mobilitatea electroforetică.

Din 50 de seruri studiate de autori, 4 au prezentat două siderofiline. După mobilitatea ei în cîmpul electric, cea de-a doua siderofilină este de tipul B_2.

Se prezintă date din literatură legate de genetica variantelor de siderofilină și de proprietățile lor funcționale.

Transportul fierului plasmatic de la un compartiment la altul al organismului este asigurat de către siderofilină.

Această proteină, cu greutatea moleculară de 90 000, are mobilitatea electroforetică a globulinelor beta-1. Acest lucru se poate pune ușor în evidență prin radioautografia electroforezei pe hîrtie a unui ser marcat cu fier radioactiv.

În 1957, Smithies [9] semnalează pentru prima dată existența mai multor tipuri de siderofiline. Faber și Jordal [3] arată că, în afară de siderofilină, serul uman mai conține încă o proteină capabilă să fixeze reversibil fierul, considerînd că aceasta ar reprezenta o treaptă intermediară între siderofilină și eritroblaști.

Cercetările făcute ulterior au arătat că există o gamă întreagă de siderofiline, care după mobilitatea lor electroforetică, pot fi încadrate în 8 tipuri diferite, notate în ordinea descrescătoare a acestei mobilități cu indicativele : B_0, B_1, B_2, C, D_0, D_1, D_2, D_3 [4–6], [8], [10–11]. Transmiterea acestor tipuri de siderofilină este condiționată genetic. Fenotipul siderofilinei unui individ este caracterizat fie prin tipul siderofilinei sale, în cazul cînd posedă o singură proteină transportatoare de fier, fie prin asociația a două sau mai multe tipuri diferite de siderofilină.

Întrucît siderofilina prezintă un interes deosebit pentru hematologie, atît din punctul de vedere genetic cît şi din cel funcţional, am considerat necesar să luăm în studiu problema determinării tipurilor ei genetice.

În lucrarea de faţă se prezintă metoda pe care o utilizăm în acest scop, precum şi unele rezultate obţinute pînă în prezent.

METODĂ

Serurile studiate au provenit de la persoane sănătoase sau cu diferite afecţiuni hematologice.

Sîngele s-a recoltat cu toate precauţiile necesare [1], pentru a se evita o încărcare a siderofilinei cu fier de pe ac sau de pe sticlărie.

Serul a fost marcat cu fier radioactiv (Fe^{59}), prin suprasaturarea lui cu o soluţie de citrat fero-(F^{59})-amoniacal. Excesul de fier nefixat a fost îndepărtat din ser cu ajutorul unei răşini anionice, Amberlit IRA-410 sau Amberlit IRA-401. Aceasta reţine ionii de fier liberi şi lasă să treacă pe cei fixaţi de siderofilină; detalii asupra acestei tehnici sînt prezentate în altă parte [1].

Serul astfel marcat a fost supus unei analize electroforetice pe hîrtie, în tampon veronal-medinal (pH 8,6). După uscarea benzii a fost efectuată radioautografia ei, punînd-o în contact cu un film fotosensibil (Agfa Röntgen Fluorapid). După un timp de 6—10 zile de impresionare, filmele au fost developate. În continuare, banda de electroforeză a fost colorată pentru proteine, apoi s-au trasat profilele densitometrice ale electroforegramei şi ale radioautografiei, determinîndu-se valorile procentuale ale ariilor cuprinse sub fiecare maxim al profilului. Această operaţie a fost efectuată cu ajutorul aparatului Elphor Integraph (Bender-Hobein).

REZULTATE

Majoritatea serurilor studiate de noi au dat la electroforeză o singură zonă radioactivă; numai la unele din ele au apărut două zone radioactive. Din aceste două zone, una corespunde $beta_1$-globulinei, iar a doua, cu activitate mai mică, era situată în regiunea globulinelor $alfa_2$.

Existenţa simultană a două siderofiline a fost constatată la 4 seruri, dintr-un total de 50 de seruri studiate.

Din cantitatea totală de fier radioactiv fixată de ambele siderofiline prezente într-un acelaşi ser, 90% au fost găsite fixate pe siderofilina $beta_1$-globulinică (în medie), iar restul de 10% pe cealaltă siderofilină.

În figura 1 sînt prezentate radioautografia şi curba densitometrică respectivă, precum şi electroforegrama unui ser care conţine o singură varietate de siderofilină. În figura 2 se prezintă aceleaşi date, în cazul unui ser conţinînd două tipuri diferite de siderofilină; în acest din urmă caz se poate vedea cu uşurinţă că fierul radioactiv a fost fixat în două zone electroforetic distincte.

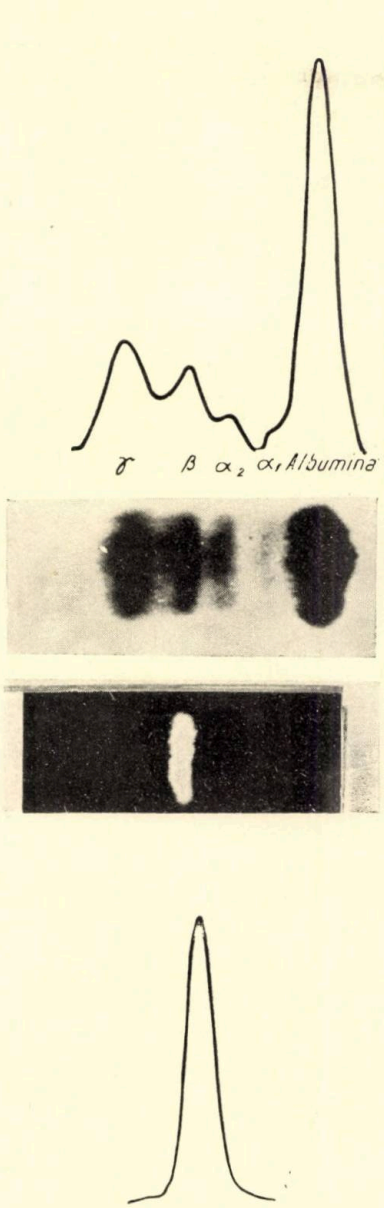


Fig. 1. — Electroforegrama și radioautografia unui ser marcat cu Fe^{59}, juxtapuse pentru aprecierea mobilității electroforetice a componentei marcate (sus : electroforegrama și profilul ei densitometric ; jos : radioautografia și profilul ei densitometric). *Cazul unui ser cu o singură siderofilină.*

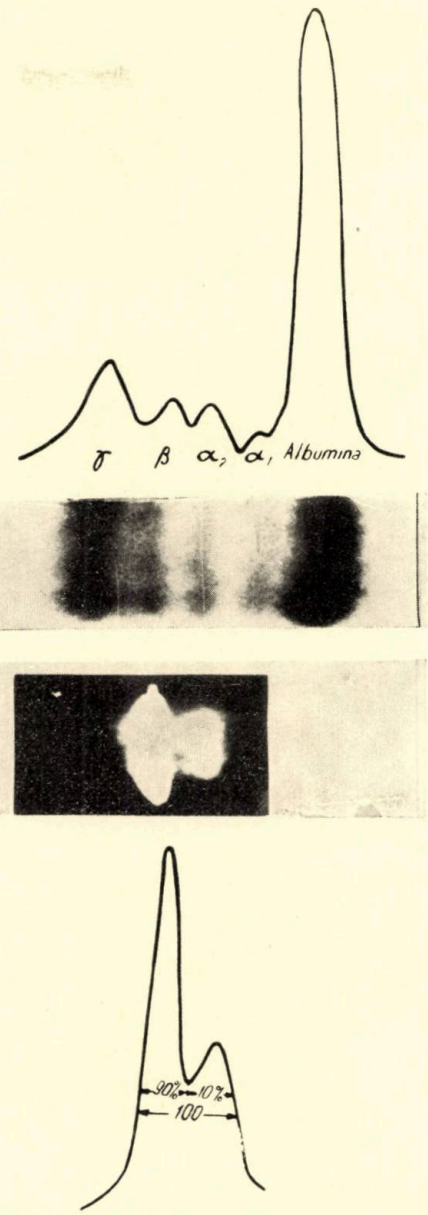


Fig. 2. — Electroforegrama și radioautografia unui ser marcat cu Fe^{59}, juxtapuse pentru aprecierea mobilităților electroforetice ale componentelor marcate (sus : electroforegrama și profilul ei densitometric ; jos : radioautografia și profilul ei densitometric). *Cazul unui ser cu două siderofiline.*

Operația de trecere a serului prin coloana de rășină schimbătoare de ioni ne-a dat certitudinea că cel de-al doilea spot radioactiv corespunde într-adevăr unei a doua siderofiline și că el nu este dat de excesul de fier radioactiv necomplexat.

DISCUȚII

Statisticile făcute pe diferite populații arată că cei mai mulți indivizi au numai o singură siderofilină, siderofilina C, și sînt presupuși a fi homozigoți. Aproximativ 1% din populația albă are atît siderofilina C, cît și siderofilina B_2, fenotipul respectiv fiind B_2C. Fenotipul CD_1 a fost găsit la 10% dintre negrii americani și este mai răspîndit la băștinașii australieni. Celelalte combinații între diversele variante de siderofilină sînt mai rar întîlnite [9], [5], [4].

Incidența relativ mare a variantelor de siderofilină la unele populații din Africa și Australia nu poate fi explicată numai prin procese de mutație, ci este mai degrabă vorba de un proces selectiv natural [3]. Martin și Jandl admit că aceste variante ar juca un anumit rol în inhibarea creșterii unor virusuri [7].

În cazul serurilor studiate de noi, cea de-a doua siderofilină a corespuns tipului B_2, după viteza ei de migrare în cîmpul electric. Cazurile noastre cu două siderofiline au prezentat fenotipul B_2C. Între cele două siderofiline prezente simultan în cele 4 seruri a existat raportul cantitativ de 1 : 9.

Variațiile structurii moleculare a diverselor tipuri de siderofilină, puse în evidență prin mobilitatea electroforetică diferită, nu sînt asociate cu modificări în ce privește legarea și transportul fierului [5]. Acest lucru s-a dovedit prin marcări duble cu Fe^{55} și Fe^{59}; astfel s-a putut constata că dispariția Fe^{55} și Fe^{59}, fixate fiecare pe cîte un tip de siderofilină, se face cu aceeași viteză. De asemenea marcarea unui ser care conține un anumit tip de siderofilină și amestecarea lui cu un ser conținînd o altă variantă de siderofilină nu duc la transferul radioactivității de pe o siderofilină pe cealaltă. Viteza cu care este fixat fierul pe proteina transportoare din plasmă nu diferă de la un tip de siderofilină la altul [3].

Aceste rezultate arată că deosebirile structurale ale siderofilinelor nu afectează proprietățile lor funcționale.

Prezentată la redacție
la 20 noiembrie 1963

Laboratorul de biochimie și izotopi radioactivi al Centrului de hematologie, București

BIBLIOGRAFIE

1. Bratu V., Teitel P., Turcu G., *Determinarea radiocromatografică pe schimbători de ioni a siderofilinei*, St. cercet. biochimie, *2*, 263 (1963).
2. Dreyfus J. C., Schapira G., *Sidérophiline — Conférence faite le 25 avril 1955, Lyon*, Paris, Masson et Cie.

3. FABER M., JORDAL E., *Presence of two iron-transport proteins in serum*, Nature (Londra), **192**, 181 (1961).
4. GIBLETT E. S., RICKMAN C. G., SMITHIES C., *Serum transferrins*, Nature (Londra), **183**, 1589 (1959).
5. HARRIS H., ROBSON E. B., SINISCALCO M., *Beta-Globulin variants in man*, Nature (Londra), **182**, 452 (1958).
6. HORSFALL W.R., SMITHIES C., *Genetic control of some human serum beta-globulins*, Science, **128**, 35 (1958).
7. MARTIN C. M., JANDL J. H., *Inhibition of virus multiplication by transferrin*, J. Clin. Invest., **38**, 1 024 (1959).
8. RAYMOND J. D., MONTI A., GLYNN M.F., *Evidence for a second iron-binding system in plasma*, J. Clin. Invest., **41**, 1354 (1962).
9. SMITHIES C., *Variations in human serum beta-globulins*, Nature (Londra), **180**, 1 482 (1957).
10. SMITHIES C., HILLER O., *The genetic control of transferrins in humans*, Biochem. J., **72**, 121 (1959).
11. TURNBULL A., GIBLOTT R. E., *The binding and transport of iron by transferrin variants*, J. Lab. Clin. Med., **57**, 450 (1961).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 165–172, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

CALITATEA PROTEINELOR PLASMEI SEMINALE

DE

L. M. BURUIANĂ, EL. HADARAG și I. BĂRBULESCU

Rezumat. — Deși proteinele constituie un compus principal al spermei necesar activității energetice și metabolice a spermatozoizilor, ele sînt puțin cercetate. În lucrare se precizează calitatea și cantitatea proteinelor plasmatice la unele specii (om, taur, berbec, vier). Se constată că, la aceste specii, proteinele plasmei seminale fac parte din clasa glucoproteinelor acide. O cantitate importantă este constituită din seromucoid, care, în cazul spermei de om, reprezintă 63% din total. Pentru natura glucoproteică a proteinelor plasmei seminale pledează conținutul ridicat în acizi uronici și al aminoacizilor aromatici (tirozină și triptofan). În ceea ce privește aminoacizii aromatici, există diferențe apreciabile între specii și chiar în sînul aceleiași specii. Reacția xantoproteică dă informații prețioase în acest sens. Cu ajutorul analizei polarografice se pot pune în evidență deosebirile dintre proteinele plasmei seminale la diferite specii. Calitatea proteinelor din plasma seminală poate să dea indicații prețioase asupra valorii biologice a unei sperme.

Proteinele din spermă joacă un rol esențial, deoarece asigură spermatozoizilor condiții favorabile de propulsie și viabilitate. De aceea, la diluarea spermei se utilizează mai ales gălbenușul de ou și laptele, lichide bogate în proteine. Calitatea proteinelor din spermă este diferită de aceea a majorității lichidelor biologice. Spermatogeneza implică biosinteza histonei specifice gameților, substanță indispensabilă fixării expresiei genetice a ADN nuclear. Proteinele plasmei seminale au de asemenea caractere specifice, fiind sintetizate diferențiat de-a lungul întregului tractus seminal. Se cunosc relativ puține date cu privire la compoziția și structura proteinelor spermatice. Vom rezuma pe cele mai importante.

Histona spermatozoizilor este asemănătoare celei din timus, compoziția ei în aminoacizi fiind totuși mai eterogenă. Cercetările lui Berry și Mayer [1], care s-au ocupat în mod amănunțit cu această chestiune, se limitează însă numai la spermatozoizii de taur.

În ceea ce privește proteinele plasmei seminale, cercetările sînt mai numeroase, însă rezultatele sînt contradictorii. Cele mai multe se referă mai ales la plasma seminală de om și taur. După Huggins, Scott și Heinen [10], plasma seminală de om conține numai între 1 și 18% proteine precipitabile la cald, iar 60% sînt dializabile. Cercetările mai recente ale lui

Dorn [9] au arătat că în plasma seminală de om se găsesc 5 fracțiuni, dintre care 4 sînt identice din punctul de vedere al vitezei de migrare cu globulinele serului sanguin. Larson și Salisbury [11] găsesc în plasma seminală de taur 11 fracțiuni în cazul separării electroforetice la pH 8,58, și numai 3 la pH 2,02, majoritatea corespunzînd ca viteză de migrare globulinelor serice. Proteinele plasmei seminale de taur sînt nedializabile și în proporție de 76% coagulabile la cald, mai ales în mediu acetic.

Deși puternic antigenice, proteinele plasmei seminale nu sînt identice cu ale serului sanguin sau ale laptelui [12].

Fracțiunea albuminică este singura care pare să fie identică cu aceea din serul sanguin. Pernot și Szumowsky [14] sînt de părere că fracțiunea albuminică provine din epididim și că o creștere peste 3% denotă tulburări ale spermatogenezei. Existența acestei fracțiuni este însă pusă la îndoială de alți autori [9], [15].

În ceea ce privește natura proteinelor plasmatice, Larson și colab. [11] găsesc că ele sînt sărace în glucide și lipide, părere care diferă de aceea a lui Ross, Moore și Miller [15], care identifică marea majoritate a proteinelor plasmei seminale cu glucoproteinele. Cercetări recente [6] au arătat că proteinele plasmei seminale conțin de circa trei ori mai multe glucide decît cele ale serului sanguin, așa încît este foarte probabil ca ele să facă parte din categoria mucoproteinelor.

În cazul spermei de vier, am constatat că majoritatea proteinelor plasmei seminale, precum și ale gelului seminal (tapioca spermatică sau coagulinele) sînt formate din mucoproteine foarte bogate în mucopolizaharide.

Din cele citate reiese că în domeniul cunoștințelor despre proteinele spermei există serioase lacune, care necesită inițierea de noi cercetări. Sîntem de părere că proteinele plasmei seminale joacă un rol important atît în procesele metabolice ale tractului genital, ale gameților înșiși, cît și în tehnica conservării și diluării spermei. Din aceste motive s-au început în acest domeniu unele cercetări al căror rezultat face obiectul prezentei lucrări.

MATERIAL ȘI METODĂ

Plasma seminală s-a obținut de la speciile menționate în cursul lucrării, prin centrifugarea spermei proaspăt recoltate. S-au determinat, conform tehnicilor descrise mai jos, proteinele totale, intensitatea reacției xantoproteice, activitatea polarografică a proteinelor plasmei seminale, seromucoidul și acizii uronici.

Dozarea proteinelor totale. Se precipitau proteinele cu acid fosfotungstic 5%, în soluție clorhidrică 2N. Utilizarea în acest scop a altor acizi, ca cel tricloracetic, sulfosalicilic, metafosforic sau percloric, nu este posibilă, deoarece precipitarea este incompletă sau nici nu se produce (cazul acidului percloric).

Se dilua 1 ml plasmă seminală cu 2 ml apă distilată şi apoi se adăugau 3 ml acid fosfotungstic-clorhidric. Precipitarea este bine să se facă la cald (baie marină). După 15 min se filtrează şi se spală cu apă caldă, acidulată cu acid fosfotungstic (1/5).

Se kjeldahlizează precipitatul şi procentul de azot se multiplică cu factorul 6,25, deşi unii autori sînt de părere că procentul de azot din proteinele plasmei seminale este de 14,4 (Larson) sau chiar de 12,1 (Sarkar). Erorile provenind din utilizarea acidului fosfotungstic, care precipită şi aminoacizii bazici din plasma seminală, sînt neînsemnate dacă se ţine seama că aceştia se găsesc în cantităţi reduse.

Intensitatea reacţiei xantoproteice. Determinarea cantitativă a proteinelor în cazul plasmei seminale are numai o valoare relativă, din cauza variabilităţii calitative foarte mari a acestora. Pentru a scoate în evidenţă diferenţele interspecifice, am recurs la reacţia xantoproteică. Această reacţie poate servi la dozarea cantitativă a proteinelor din anumite medii [5]. Ea poate să dea informaţii şi asupra variaţiei conţinutului în anumiţi aminoacizi (tirozina şi triptofanul), ceea ce s-a constatat în cazul proteinelor din plasma seminală. Aprecierea intensităţii acestei reacţii se face în modul următor : se diluează plasma seminală cu apă distilată de 5 ori ; se ia apoi foarte exact 0,1 ml, care se pune într-o eprubetă Jena obişnuită ; se se adaugă 1 ml acid azotic conc. ($d = 1{,}41$) şi se fierbe circa 30 s direct pe flacără. Apoi, se neutralizează, sub răcire continuă, cu hidroxid de sodiu 40%. Se transvazează cantitativ într-o fiolă gradată, aducîndu-se volumul la 10 ml. Se fotocolorimetrează contra apei distilate cu filtrul S_{43} (430 mμ). Diferitele extincţii pentru cantităţi variabile de plasmă seminală se găsesc pe o dreaptă care trece prin originea unui sistem de axe perpendiculare. Extincţia se poate aprecia şi în funcţie de cantitatea totală de proteine, determinată aşa cum s-a precizat la dozarea proteinelor totale. Se constată că intensitatea reacţiei xantoproteice variază nu numai cu cantitatea de proteină pe care o conţine plasma seminală, ci şi cu specia.

Activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală. Cercetări anterioare ne-au arătat că activitatea polarografică a proteinelor depinde de structura şi compoziţia lor [2], [3], [4], [5], [7]. S-a determinat de aceea activitatea polarografică a plasmei seminale la unele specii, în conformitate cu tehnica descrisă anterior [2].

Dozarea seromucoidului. S-a utilizat tehnica propusă de Winzler [16], modificată în sensul că precipitarea proteinelor, afară de seromucoid, se făcea cu acid tricloracetic 10% (0,61 M) şi nu cu acid percloric 18% (0,125 M), care nu precipită de loc în cazul spermei. Cantitatea de seromucoid se exprimă în tirozină. Pentru calcularea în greutate se multiplică cu factorul 27,7, dacă admitem că seromucoidul din spermă conţine aceeaşi cantitate de tirozină ca cel din serul sanguin.

Dozarea acizilor uronici. Se bazează pe reacţia de culoare pe care aceşti acizi ai glucidelor o dau cu naftorezorcina. Reacţia cu carbazol nu se poate aplica în cazul spermei, din cauza conţinutului ridicat în hexoze. Tehnica de lucru adoptată este următoarea : într-o fiolă de centrifugă se pun 5 ml alcool etilic de 96°, în care se adaugă 0,1 ml spermă de analizat. Se agită şi după 5 min se centrifughează. După scurgerea completă a supernatantului, se dizolvă precipitatul în 2 ml HCl 30%. Se adaugă 2 ml soluţie proaspătă de naftorezorcină apoasă 0,2% şi se ţine în baie, la fierbere, timp de 30 min. După răcire, se adaugă 6 ml alcool amilic incolor redistilat şi se extrage culoarea formată prin agitare. Se centrifughează şi se compară la fotocolorimetru culoarea alcoolului amilic cu aceea a unui martor identic preparat, dar fără spermă. Citirea se face utilizînd filtrul S_{57} (570 mμ) şi comparînd cu o curbă-etalon obţinută cu lactona acidului glicuronic. Între limitele 0,1 şi 1,0 mg legea lui Beer-Lambert se verifică, valorile extincţiei găsindu-se pe o dreaptă care trece prin origine.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

În tabela nr. 1 sînt redate unele rezultate ale determinărilor efectuate. Reiese că plasma seminală de taur este cea mai bogată în proteine. În unele cazuri rezultatele obţinute sînt mai mari decît cele indicate în literatură, oscilînd între 4,11 şi 14,70 g%. La celelalte specii cercetate,

Tabela nr. 1

Conţinutul plasmei seminale de la unele specii de animale şi la om în proteine totale, seromucoid şi acizi uronici

Specia	Rasa	Vîrsta (în ani)	Nr. spermatozoizi (10^6/ml)	Proteine (în g%)	Seromucoid (în mg tirozină la 100 ml ser)	Acizi uronici (în g% acid glicuronic)
Taur	Brună	5	1,090	13,82	15,00	0,560
,,	,,	,,	0,520	4,11	22,10	0,530
,,	,,	,,	0,960	14,70	17,50	0,690
,,	,,	,,	1,150	10,12	18,30	0,570
,,	,,	,,	0,630	4,62	24,30	0,680
,,	,,	,,	0,980	9,84	19,30	0,700
,,	,,	,,	0,510	5,34	31,30	0,520
,,	,,	6	0,840	9,06	18,50	0,720
,,	,,	6	0,800	7,26	17,50	0,720
,,	Simmenthal	6	0,400	5,40	36,50	0,360
,,	,,	6	1,360	7,86	16,00	1,000
,,	Brună	5	0,860	10,20	20,00	0,720
Berbec	Ţigaie	3	3,550	2,30	16,00	0,560
,,	,,	,,	4,300	2,27	19,50	0,320
,,	,,	,,	4,350	1,75	15,40	0,300
,,	,,	,,	3,300	2,50	15,00	0,400
,,	,,	,,	3,100	3,24	13,20	0,325
,,	,,	,,	3,500	2,34	15,00	0,310
Vier	Landrace	3	0,100	3,72	17,50	0,125
,,	Marele Alb	,,	0,110	3,50	16,50	0,115
,,	,,	,,	0,090	0,70	8,50	0,100
,,	York	4	0,098	0,61	3,85	0,105
Om	—	40	0,100	3,18	70,00	0,540
,,	—	35	0,082	3,98	70,00	0,840
,,	—	50	0,100	3,01	81,00	0,600
,,	—	28	0,120	3,76	82,00	0,480
,,	—	38	0,110	3,00	75,00	0,510

valorile sînt mai mici. Plasma seminală de vier este foarte săracă în proteine, mai ales în cazul cînd formarea gelului seminal este abundentă. Plasma seminală de berbec este de asemenea săracă în proteine, chiar în cazul unor sperme foarte bogate în spermatozoizi. Viabilitatea spermatozoizilor depinde în mare măsură de cantitatea şi calitatea proteinelor plasmatice. Din datele de pînă acum reiese că pentru aceeaşi specie viabilitatea descreşte cu conţinutul în glucoproteine.

Intensitatea reacţiei xantoproteice variază cu specia, aşa cum reiese din curbele trasate în figura 1.

Deoarece culoarea se datorește nitroderivaților formați de către aminoacizii aromatici, rezultă că proteinele plasmei seminale conțin cantități variabile din aceștia. Se vede din figura 1 că proteinele din plasma seminală de taur dau cea mai intensă reacție xantoproteică, iar cele de vier pe cea mai slabă.

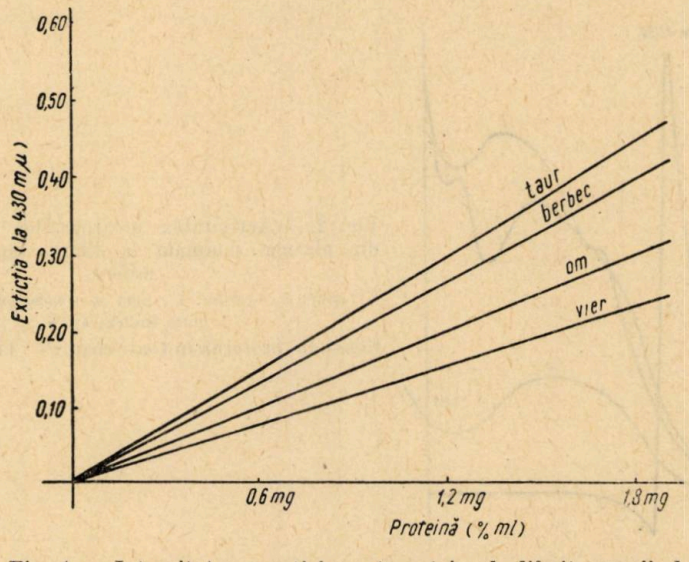


Fig. 1. — Intensitatea reacției xantoproteice la diferite specii de mamifere. Reacția cromogenică s-a efectuat pentru proteinele izolate din plasma seminală.

Chiar pentru aceeași specie intensitatea reacției variază între anumite limite, independent de concentrația în proteină, ceea ce denotă că încorporarea aminoacizilor aromatici este influențată de anumiți factori de mediu sau de activitatea fiziologică a tractului seminal.

Activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală pune de asemenea în evidență existența unor deosebiri remarcabile între aceste substanțe la diferite specii. Din figura 2 se vede că proteinele din plasma seminală de taur sînt mult mai active din punct de vedere polarografic decît cele de om.

Cantitatea de seromucoid din plasma seminală variază de asemenea cu specia. Cea mai mare cantitate a fost găsită în sperma de om. Presupunînd că procentul de tirozină din seromucoidul spermei este identic cu cel al serului sanguin, pentru media valorilor în proteină ale plasmei seminale de om (3,6 g %) rezultă că 63 % din aceasta este constituită din seromucoid. Din contra, în cazul plasmei seminale de vier, cantitățile de seromucoid sînt foarte mici, atingînd valori identice cu ale serului sanguin, respectiv (3—4 mg/100 ml). De obicei cantitatea de seromucoid din plasma seminală este de 5—10 ori mai mare decît cea a serului sanguin respectiv.

În ceea ce priveşte conţinutul în acizi uronici, se constată că, spre deosebire de glucoproteinele sanguine, cele din plasma seminală sînt deosebit de bogate. Singurele date găsite în literatură cu privire la prezenţa acizilor uronici din proteinele plasmei seminale sînt cele ale lui

Fig. 2. — Activitatea polarografică a proteinelor din plasma seminală la diferite specii de mamifere.

2 — taur; *3* — berbec; *4* — om; *m* — polarogramă martor, soluţia Brdicka $Co^{3}+$.

Conc. în proteină în toate cazurile : 11,8 mg/100 ml.

Lutwak-Mann şi Rowson [13], care obţin o reacţie pozitivă pentru acidul glucuronic în fracţiunea prespermatică. Determinările noastre arată că cea mai mică cantitate de acizi uronici se găseşte în plasma seminală de vier. Faptul poate fi pus în legătură cu formarea gelului seminal caracteristic pentru sperma acestei specii.

CONCLUZII

1) Cantitatea totală a proteinelor din plasma seminală variază cu specia. Dintre speciile cercetate, cea mai mare cantitate se găseşte în sperma de taur (4,10—14,60 g%) şi cea mai mică în cea de vier (uneori sub 1%).

2) Proteinele plasmei seminale au caractere de glucoproteine acide, conţinînd mulţi acizi uronici. Conţinutul în seromucoid este de asemenea apreciabil. Sperma de om conţine cea mai mare cantitate de seromucoid (70 mg/100 ml, calculat în tirozină), iar cea de vier cea mai redusă (4 mg/100 ml).

3) Intensitatea reacţiei xantoproteice a proteinelor din plasma seminală variază cu specia. Chiar în sînul aceleiaşi specii se observă oscilaţii,

ceea ce denotă că proteinele plasmei seminale se modifică ușor sub influența anumitor factori.

4) Această variabilitate a naturii și structurii proteinelor din plasma seminală se poate pune în evidență și după activitatea lor polarografică.

Prezentată la redacție
la 31 decembrie 1963

Catedra de chimie biologică,
Institutul de medicină veterinară, București

BIBLIOGRAFIE

1. Berry R. E., Mayer D. T., *The histone-like basic protein of bovine spermatozoa*, Exp. Cell Res., **20**, *1*, 116 (1960).
2. Buruiana L. M., Pavlu V., *Le comportement polarographique du sperme*, Naturwiss., **44**, *22*, 589 (1957).
3. Buruiana L. M., Pavlu V., *Quelques particularités des protéines du maïs révélées par l'analyse polarographique*, Naturwiss., **45**, *20*, 492 (1958).
4. Buruiană L. M., Pavlu V., *Comportarea polarografică a laptelui și a proteinelor din lapte*, St. cerc. chimie, **VI**, *1*, 139 (1958).
5. Buruiana L. M., *Le dosage des protéines du lait à l'aide de la réaction xantho-protéique*, Le Lait, **39**, 260 (1959).
6. Buruiana L. M., Hadarag El., *Sur les glucides liés du plasma séminal*, Naturwiss., **49**, *13*, 303 (1962).
7. Buruiană L. M., Hadarag El., Pavlu V., *Cercetări cu privire la proteinele din plasma seminală*, St. cerc. biochimie, **V**, *4*, 507 (1962).
8. Buruiană L. M., Pavlu V., *Activitatea polarografică a proteinelor serice și a filtratelor sulfosalicilice la diferite specii de animale*, St. cerc. biochimie, **VI**, *2*, 207 (1963).
9. Dorn H., *Elektrophorese des Sperma Plasmas*, Arch. Klin. Exp. Derm., **113**, 759 (1961).
10. Huggins C., Scott N. W., Heinen J. H., Am. J. Physiol., **136**, 467 (1942), citat după Larson B. L. și Salisbury G. W. [11].
11. Larson B. L., Salisbury G. W., *The proteins of bovine seminal plasma. I. Preliminary and electrophoretic studies*, J. Biol. Chem., **206**, *2*, 741 (1954).
12. Larson B. L., Gray R. S., Salisbury G. W., *The proteins of bovine seminal plasma. II. Ultracentrifugal and immunological studies and comparison with blood and milkserum*, J. Biol. Chem., **211**, *1*, 43 (1954).
13. Lutwak-Mann C., Rowson L. E. A., *The chemical composition of the pre-sperm fraction of bull ejaculate obtained by electrical stimulation*, J. Agr. Sci., **43**, 131 (1953).
14. Pernot E., Szumowski P., *Etude électrophorétique et immuno-électrophorétique des protéines du plasma séminal de taureau*, Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, *11*, 1 423 (1958).
15. Ross V., Moore D. H., Miller E. G., *Proteins of human plasma*, J. Biol. Chem., **144**, 667 (1942).
16. Winzler R. J., *Determination of serum glycoproteins*, în Glick D., *Methods of Biochemical Analysis*, Interscience Publ. Inc., New York, **III**, 279 (1955).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 173–182, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

STUDIUL CONDIȚIILOR ÎN CARE OXALACETATUL INHIBĂ OXIDAREA SUCCINATULUI DE CĂTRE MITOCONDRII

DE

ELENA CRISTEA

Rezumat. — S-a studiat efectul adăugării de OAA asupra respirației mitocondriale cu succinat ca substrat în funcție de prezența dinitrofenolului, a ATP, a ionilor fluor, și de integritatea mitocondriilor. Cu mitocondrii intacte, în absență de DNP, respirația se desfășoară liniar timp de 60—80 min. Adăugarea de OAA (5 mM) are acțiune inhibitorie numai în absență de ATP; în prezență de ATP (0,5 mM), viteza respirației nu se modifică după adăugare de OAA. În prezență de DNP (20 μM) și în absență de ATP, viteza respirației scade în timp, iar adăugarea de OAA grăbește și adîncește această inhibiție. În prezență de ATP, de DNP și de KF (14 mM) respirația suferă succesiv inhibiții și reactivări puternice. Adăugarea de OAA nu determină alte modificări ale vitezei respirației decît cele care au loc și în absența lui. Omiterea fluorurii din mediu atenuează gradul inhibițiilor și al reactivărilor. În absență de ATP, de DNP, de KF și de OAA viteza respirației crește de mai mult de două ori în primele 30 min apoi scade la nivelul inițial. Adăugarea de OAA (5 mM) la mitocondrii deteriorate prin înghețare și dezghețare, prin învechire, inhibă prompt și complet respirația cu succinat.

În prezență de concentrații mijlocii de decuplanți ai fosforilării oxidative s-a observat o inhibare a respirației mitocondriale, utilizînd succinatul ca substrat [1—9]. Borst și Slater [1] au observat inhibiția consumului de oxigen de către mitocondrii din ficat, la concentrații ale DNP * de circa 30 μM (la o concentrație de 16 μM nu s-a observat această inhibiție). Slater și Hüllsmann [2] au arătat că viteza oxidării succinatului de către sarcozomii din inimă este redusă în prezență de 50 μM DNP. Azzone și Ernster [3], [4], Williams [5], Schollmeyer și Klingenberg [6] au găsit că mitocondriile pretratate cu DNP nu mai respiră la adăugarea succinatului. Chappell [7], [8] și Chance și colab. [9] au observat de asemenea inhibări ale oxidării succinatului în prezență de decuplanți.

* Prescurtările utilizate: DNP — 2,4-dinitrofenol, OAA — oxalacetat, ADP — adenozindifosfat, ATP — adenozintrifosfat, NAD — nicotinamid-adenin-dinucleotid oxidat, EDTA — etilendiamin tetraacetat, Tris — tris(hidroximetil)aminometan.

Într-o lucrare anterioară [10] am arătat că captarea de oxigen de către mitocondriile intacte din ficat de şobolan, cu succinat ca substrat şi în prezenţă de DNP (20 μM), suferă succesiv inhibiţii şi activări puternice. Gradul de inhibiţie a respiraţiei era de circa 80%, iar reactivările care urmau, readuceau viteza respiraţiei pînă la valoarea iniţială. Cu unele preparate mitocondriale s-au obţinut (cu succinat 30 mM), în decurs de 90 de minute, 3 cicluri de inhibiţie-activare. S-a arătat [10] că instalarea inhibiţiei era determinată de prezenţa OAA în sistem. Într-adevăr, factorii care favorizau formarea de OAA grăbeau inhibarea respiraţiei, iar cei care favorizau îndepărtarea OAA o preveneau sau o înlăturau. În perioada de activare care urma inhibiţiei, substratul principal care se oxida era succinatul, deoarece adăugarea de malonat împiedica această activare.

În experienţe în care în mediul de reacţie s-a introdus OAA (2,5 mM), după un anumit interval de la începerea măsurătorii s-au constatat inhibări puternice ale respiraţiei. Părea că inhibiţia observată era consecinţa directă şi imediată a OAA adăugat. Reluînd aceste experienţe, am constatat că OAA, introdus în mediu pînă la o concentraţie de 5 mM, nu are acţiune inhibitorie numai prin simpla lui prezenţă, ci şi prin faptul că sistemul a devenit sensibil la acţiunea sa. În lucrarea de faţă am cercetat condiţiile în care OAA are acţiune inhibitorie asupra respiraţiei mitocondriale ; s-a studiat efectul inhibitor al OAA în funcţie de prezenţa DNP, ATP,ionilor fluor, ca şi de starea mitocondriilor.

Experienţe similare cu ale noastre au fost raportate de Jones şi Gutfreund [11], care au constatat că OAA adăugat nu are acţiune inhibitorie asupra respiraţiei mitocondriilor care fosforilează, ci numai asupra respiraţiei mitocondriilor în prezenţă de dinitrofenol.

METODE

S-a lucrat cu mitocondrii intacte din ficat de şobolan. S-a acordat o atenţie deosebită protejării mitocondriilor în timpul omogenizării ţesutului şi izolării lor. Omogenizarea ficatului s-a făcut în două etape, cu un omogenizator de sticlă cu piston de plexiglas. Mediul de omogenizare a fost manitolul 0,3 M [12]. Depunerea nucleelor şi a resturilor celulare s-a făcut prin două centrifugări de 10 min la 600 g. După cele două centrifugări, supernatantele au fost reunite şi mitocondriile au fost depuse prin centrifugare la 5 000 g, timp de 15 min. Mitocondriile au fost spălate o dată sau de două ori cu manitol 0,3 M şi apoi depuse din nou. Mitocondriile au fost apoi suspendate într-un amestec de manitol (0,27 M)-Tris-HCl (0,03 M)-zaharoză (0,03 M) [12] şi omogenizate blînd, prin manipularea pistonului cu mîna.

Proteinele din suspensia mitocondrială au fost dozate prin metoda biuretului, modificată de Aldridge [13]. Consumul de oxigen s-a măsurat cu tehnica manometrică Warburg, utilizîndu-se cupe cu 2 diverticule. În toate experienţele, mediul de incubaţie „standard" a cuprins (în concentraţii finale) : tampon fosfat de potasiu 15 mM (pH 7,4), $MgSO_4$ 6,7 mM, citocrom *c* 0,02 mM, EDTA 1 mM, zaharoză 0,1 M, succinat 30 mM. În unele expe-

rienţe, mediul de incubaţie „standard" a fost suplimentat cu KF 14 mM, DNP 20 μM, ATP 0,5 mM, OAA 5 mM (aceste adaosuri sînt menţionate în legendele figurilor). Substratul şi celelalte componente ale mediului au fost pipetate în compartimentul principal al cupei, iar reacţia a fost iniţiată prin trecerea mitocondriilor dintr-un diverticul al cupei în compartimentul principal, după 5—7 minute de termoechilibrare la 25°C. În unele experienţe, din celălalt diverticul al cupei s-a adăugat OAA în cursul reacţiei. Volum final : 2 ml. În fîntîna centrală a cupei s-au pipetat 0,2 ml KOH 10%.

REZULTATE

Efectul OAA asupra desfăşurării în timp a respiraţiei mitocondriale, cu succinat în prezenţă de DNP (20 μM). În tabela nr. 1 sînt arătate vitezele respiraţiei (μ atomi O_2) în primele 5 min după începerea măsurătorii, în prezenţa şi în absenţa OAA. Aşa cum rezultă din tabelă, prezenţa OAA

Tabela nr. 1

Efectul adăugării de OAA asupra vitezei iniţiale a consumului de oxigen de către mitocondrii cu succinat ca substrat şi în prezenţă de DNP

Condiţii de incubare : Mediul de incubaţie „standard" (descris la metode) a cuprins în plus DNP 20 μM, ATP 0,5 mM, KF 14 mM în unele cupe, OAA 5 mM. Suspensia de mitocondrii (10—12 mg) într-un amestec manitol (0,27 M)-zaharoză (0,03M)-Tris-HCl(0,03 M) a fost răsturnată în compartimentul principal după 5—7 min de termoechilibrare la 25°C. Volum final, 2 ml.

Experienţa nr.	Consumul de oxigen în intervalul 0—5 min (în μ atomi O_2)	
	— OAA	+ OAA 5 mM
1	4,20	3,75
2	3,49	4,76
3	3,12	3,24
4	2,62	2,44
5	3,92	3,75

în mediu (5 mM) nu afectează viteza iniţială a consumului de oxigen. De asemenea, variaţiile în timp ale vitezei respiraţiei nu sînt influenţate în mod semnificativ de adăugarea OAA în sistemul de reacţie. În figura 1 sînt arătate curbele de variaţie ale vitezei respiraţiei în absenţă de OAA (curba ●—●), apoi în prezenţă de OAA 5 mM, introdus în mediul de reacţie înaintea mitocondriilor (curba +—+), precum şi în prezenţă de OAA adăugat din celălalt diverticul al cupei, la 20 min după declanşarea reacţiei (curba o — o). Se observă că variaţiile vitezei consumului de oxigen în aceste 3 cazuri sînt similare. Dacă adăugarea de OAA s-a făcut înaintea mitocondriilor, nu se constată vreo modificare a vitezei iniţiale sau o inhibiţie mai rapidă a respiraţiei ; dacă OAA a fost adăugat după ce o parte din succinat s-a oxidat, nici în acest caz respiraţia nu se inhibă

mai înainte de a se fi inhibat în cupa în care nu s-a adăugat OAA. Gradul de inhibiție a respirației în prezență de OAA nu este mai mare decît în absența lui. În unele experiențe (neprezentate în figura 1), prima stare de inhibiție a respirației s-a instalat mai tîrziu, în altele mai devreme, dar în cele mai multe cazuri simultan cu cea din sistemele în care nu s-a

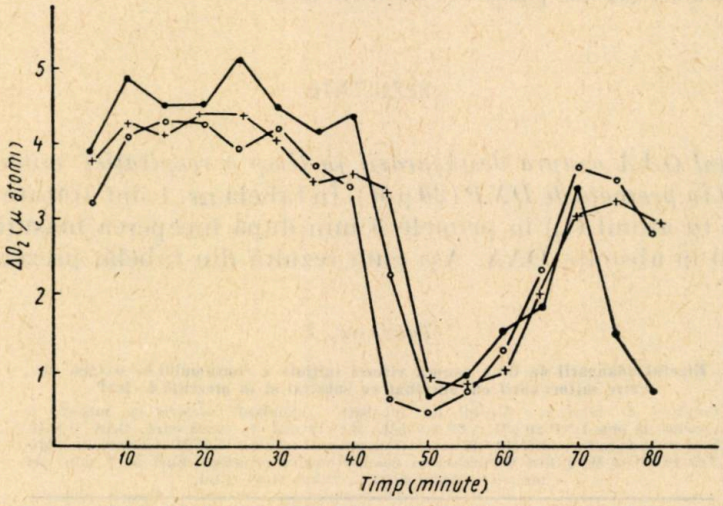


Fig. 1. — *Efectul OAA asupra desfășurării în timp a respirației mitocondriale cu succinat, în prezență de DNP.*

Mediul de incubație „standard" a cuprins în plus DNP 20 µM, ATP 0,5 mM, KF 14 mM. Curba ●—● fără OAA; curba + — + cu OAA (5m M) în mediu de la timpul zero; curba ○—○ cu OAA (5 mM) adăugat după 20 min (14 mg proteină mitocondrială).

adăugat OAA. Reactivarea spontană a respirației și repetarea ciclurilor inhibiție-activare au loc și în prezență de OAA.

Efectul OAA asupra desfășurării în timp a respirației mitocondriale, cu succinat în absență de DNP. În absență de DNP, respirația în mitocondriile strîns cuplate se desfășoară cu viteză mică [14]. În aceste condiții, produșii finali ai oxidării succinatului sînt fumaratul și malatul [7], [8]. Chappell [7], chiar în prezență de DNP 10—20 µM, nu constată oxidarea succinatului pînă la OAA și inhibarea respirației. În experiențele noastre am constatat că viteza respirației în absență de DNP este constantă în tot cursul perioadei experimentale (60—90 min; fig. 2, curba ▲—▲). Totuși, adăugarea de OAA (5 mM) nu inhibă de loc respirația (fig. 2, curba ■—■). Aceste date par să arate că nu numai lipsa formării OAA poate fi explicația lipsei de inhibiție a respirației. Curba ●—● din figura 2 arată desfășurarea în timp a respirației în prezență de DNP.

Efectul OAA asupra respirației cu succinat în mitocondrii deteriorate. S-a cercetat efectul adăugării de OAA asupra respirației mitocondriilor deteriorate prin diferite procedee: prin înghețări și dezghețări repetate și prin învechire 24 de ore la 2—5°C sau 3 ore la 37°C. În absență de OAA, aceste mitocondrii, independent de prezența DNP, respiră cu viteză ridi-

cată şi relativ constantă. Adăugarea de oxalacetat, pînă la o concentraţie finală de 5 mM, inhibă complet respiraţia, fie că adăugarea s-a făcut la timpul zero, fie după un anumit interval de timp.

Efectul ionilor de fluor asupra respiraţiei mitocondriilor cu succinat şi asupra capacităţii OAA de a inhiba respiraţia. Experienţele descrise în

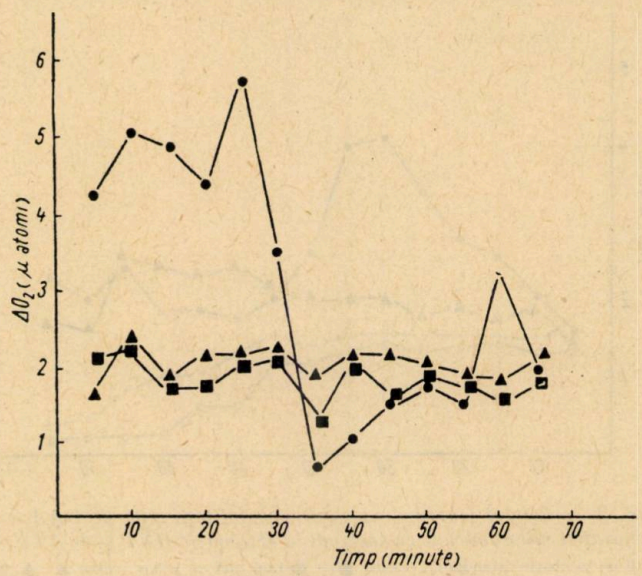


Fig. 2. — *Efectul OAA asupra desfăşurării în timp a respiraţiei mitocondriale cu succinat în absenţă de DNP.*

Mediul de incubaţie „standard" a cuprins în plus ATP 0,5 mM şi KF 14 mM. Curba ● – ● cu DNP (20 μM); curba ▲–▲ fără nici un adaos; curba ■ – ◧ cu OAA (5 mM) adăugat după 15 min (12 mg proteină mitocondrială).

tabela nr. 1 şi în figurile 1 şi 2, ca şi cele prezentate anterior [10], au fost efectuate în prezenţă de fluorură în mediul de incubaţie, într-o concentraţie finală de 14 mM. Omiterea fluorurii din mediu determină modificări importante ale comportării sistemului, atît în ceea ce priveşte variaţiile în timp ale vitezei consumului de oxigen, cît şi în ceea ce priveşte sensibilitatea respiraţiei la inhibiţia prin OAA.

Efectul fluorurii în absenţă de DNP şi de ATP. În absenţă de DNP, de ATP şi de fluorură, viteza iniţială a respiraţiei este mică, iar în perioada următoare are loc o creştere treptată a vitezei, astfel că, după 25—30 min, respiraţia atinge o viteză aproape dublă faţă de aceea din primele 5 min. În 5 experienţe, creşterea medie a vitezei consumului de oxigen a fost de 2,4 ori (1,8—3,9). După perioada de respiraţie maximă urmează o inactivare treptată, pînă la nivelul respiraţiei iniţiale. În prezenţă de fluorură, viteza respiraţiei este constantă în tot cursul perioadei experimentale. În figura 3 sînt reprezentate vitezele consumului de oxigen în absenţă de DNP şi ATP, curba ● – ● fără fluorură şi curba ▲—▲ cu KF 14 mM în mediu. Curbele o–o şi +—+ din figura 3 repre-

zintă variațiile vitezei respirației în probe în care OAA 5 mM a fost prezent de la începutul experienței (curba o – o fără KF și curba + – + cu KF). Se constată că respirația se desfășoară cu viteză constantă timp de 40–45 min, apoi începe o inhibiție treptată și continuă. De remarcat că efectul OAA se face simțit abia după un timp de la inițierea reacției

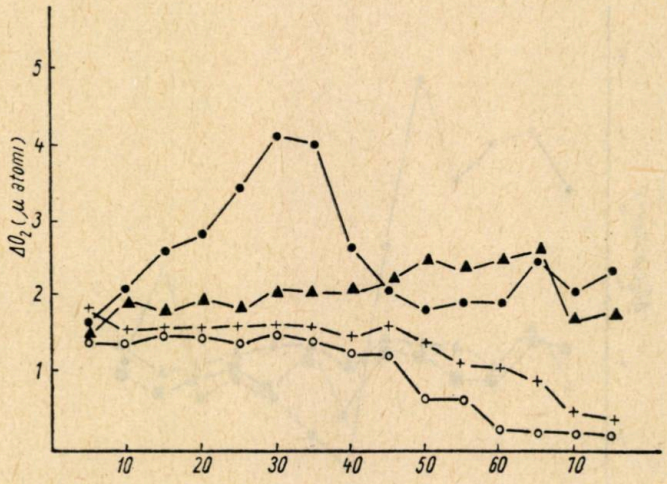


Fig. 3. — *Efectul fluorurii asupra sensibilității față de OAA a respirației mitocondriale cu succinat în absență de DNP și de ATP.* Mediul de incubație „standard". Curba ● – ● fără nici un adaos; curba ▲–▲ cu KF (14 mM); curba o – o cu OAA (5 mM) adăugat la timpul zero; curba + – + cu KF (14 mM) și OAA (5 mM) adăugat la timpul zero (10 mg proteină mitocondrială).

(40–45 min) și că nu se constată deosebiri între probele care cuprind și cele care nu cuprind fluorură în mediu.

Efectul fluorurii în prezență de DNP și în absență de ATP. Prezența sau absența fluorurii în mediul de reacție, în prezență de DNP, dar în absență de ATP, nu afectează în mod semnificativ variațiile vitezei respirației. În absență de OAA are loc o inhibiție continuă a respirației, care începe mai devreme decît în cazurile cînd în mediu este prezent ATP. Adăugarea de OAA grăbește instalarea inhibiției și o adîncește; inhibiția respirației atinge valori pînă la 100% (fig. 4, curba o–o fără fluorură și curba + – + cu fluorură).

Efectul fluorurii în prezență de DNP și de ATP. Variațiile ciclice „inhibiție-activare" ale respirației au fost obținute cu fluorură în mediul de incubație. Omiterea fluorurii din mediu menține mai mult timp consumul de oxigen la valori ridicate, inhibiția este mai puțin pronunțată, iar reactivarea se face mai lent sau pînă la valori mai mici (uneori chiar nemaiavînd loc). Adăugarea de OAA în absență de fluorură, ca și în prezența acesteia, nu determină modificări ale vitezei respirației altele decît cele care au loc în mod spontan și în absența ei. În figura 5 este prezentată o experiență în care se compară efectul fluorurii în aceste condiții.

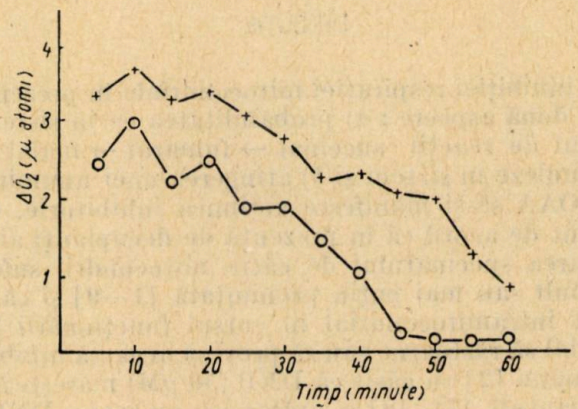


Fig. 4. — *Efectul fluorurii asupra sensibilității față de OAA a respirației mitocondriale cu succinat în prezență de DNP și în absență de ATP.*

Mediul de incubație „standard" a cuprins în plus DNP 20 µM și OAA 5 mM. Curba ○ – ○ fără fluorură ; curba + – + cu KF (14 mM) (12 mg proteină mitocondrială).

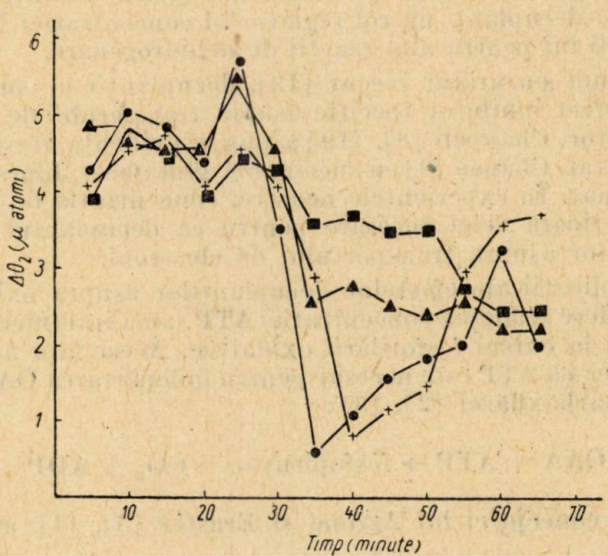


Fig. 5. — *Efectul fluorurii asupra vitezei respirației mitocondriale cu succinat în prezență de DNP și de ATP.*

Mediul de incubație „standard" a cuprins în plus DNP 20 µM și ATP 0,5 mM. Curba ● – ● cu KF (14 mM) ; curba + – + cu KF (14 mM) și OAA (5 mM) adăugat la 15 min ; curba ▲ – ▲ fără nici un adaos ; curba ■ – ■ cu OAA (5 mM) adăugat după 15 min (12 mg proteină mitocondrială).

DISCUȚIE

Problema inhibiției respirației mitocondriale în prezență de succinat ca substrat are două aspecte : *a*) probabilitatea ca în sistemul de reacție să aibă loc șirul de reacții succinat → fumarat → malat → OAA și ca OAA să se acumuleze în sistem și *b*) atingerea unei anumite stări a sistemului în care OAA să-și manifeste acțiunea inhibitorie. Cei mai mulți dintre autori sînt de acord că în prezență de decuplanți ai fosforilării de respirație oxidarea succinatului de către mitocondrii suferă în timp o inhibiție mai mult sau mai puțin pronunțată [1—9] și că ATP exogen, sau cel generat intramitocondrial în cursul funcționării lanțului respirator, este capabil să răstoarne sau să prevină această inhibiție [15], [16]. Slater și Hüllsmann [2] au găsit că DNP (50 μM) mărește nivelul OAA în mitocondrii. Chappell [7], [8] a arătat că prezența DNP promovează reacția malat-dehidrogenazei și acumularea de OAA. Chance [17] susține că reacția de reducere endergonică a NAD prin succinat este sensibilă față de agenți decuplanți, chiar la concentrații la care nu s-a produs decuplarea fosforilării de respirație ; inhibiția acestei reacții mărește gradul de oxidare a NAD, iar în aceste condiții este favorizată reacția malat-dehidrogenazei și acumularea de OAA [18]. Chance [18] atribuie reducerii endergonice a NAD prin succinat și sensibilității ei la concentrații joase de decuplanți un rol reglator al concentrației NAD oxidat și disponibilității lui pentru alte reacții de dehidrogenare.

După cum s-a arătat recent [19], decuplanții în concentrații mai mari au un efect inhibitor specific asupra transferului de electroni prin lanțul respirator. Chappell [8], [19] a pus în evidență acest efect cu succinat ca substrat, Chance [9] cu succinat și glutamat, Jones și Gutfreund [11] cu succinat. În experiențele noastre, concentrația de DNP utilizată este însă inferioară celei necesare pentru ca decuplantul să-și exercite efectul inhibitor asupra transportului de electroni.

Alte explicații ale efectelor decuplanților asupra oxidării succinatului au în vedere scăderea concentrației ATP sau a intermediarilor macroergici formați în cursul fosforilării oxidative. Acest fapt ar afecta respirația prin aceea că ATP este necesar pentru îndepărtarea OAA prin reacția fosfopiruvat-carboxilazei [2], [5] :

$$OAA + ATP \rightarrow \text{fosfopiruvat} + CO_2 + ADP$$

sau, conform concepției lui Azzone și Ernster [3], [4], activării succinatului.

Schollmeyer și Klingenberg [6] au găsit că activarea respirației, care fusese inhibată prin preincubarea mitocondriilor cu DNP, este întovărășită de creșterea concentrației ATP. Nu au găsit însă o corelație între concentrația OAA în sistem și gradul de inhibiție a respirației. Unii agenți activează respirația cu succinat, fără a determina și o reducere a cantității de OAA din sistem ; alții îndepărtează OAA, fără a activa însă respirația.

Concentrațiile de OAA utilizate în experiențele prezentate în această lucrare (5 mM) determină o inhibiție promptă și completă numai cînd mitocondriile au fost lezate prin diferiți agenți fizici și și-au pierdut controlul respirator. În absență de OAA exogen, respirația cu mitocondrii lezate se desfășoară liniar, ceea ce arată că în cursul oxidării succinatului nu se formează OAA.

DNP (20 μM), în absență de ATP, cu toate că nu determină o decuplare a fosforilării de respirație tot atît de puternică ca cea produsă prin deteriorarea mitocondriilor, determină totuși o inhibare în timp a respirației, iar OAA exogen are un efect mult mai redus. Putem admite deci că în cursul oxidării succinatului se formează OAA și că sistemul este sensibil la inhibiția prin OAA (OAA exogen are un efect inhibitor suplimentar). În prezență de DNP (20 μM) și de ATP (0,5 mM), OAA exogen nu mai determină modificări suplimentare față de cele care au loc și în absența lui. Se pare că în aceste condiții factorul care determină viteza respirației nu este concentrația OAA, ci nivelul ATP sau al intermediarilor macroergici.

În două din cazurile studiate fluorura a exercitat efecte interesante și oarecum paradoxale. În prezență de DNP și de ATP, numai cu fluorură în mediul de reacție, s-au obținut inhibiții și activări puternice ale respirației ; în absența fluorurii, inhibițiile au fost mai puțin pronunțate, iar reactivările lente și neregulate. Din contra, în absență de DNP și de ATP, accelerarea respirației în timp nu s-a observat decît dacă fluorura a fost omisă din mediu. Nu putem înțelege în ce fel fluorura afectează respirația mitocondrială cu succinat ca substrat, dar este probabil ca explicarea acțiunii ei să poată lămuri care este factorul hotărîtor al posibilității de inhibare a respirației : prezența OAA sau concentrația ATP.

CONCLUZII

Studiul variațiilor spontane ale respirației mitocondriale cu succinat în diferite condiții — în prezență de DNP, de ATP, de KF — și al celor determinate de OAA adăugat arată că inhibițiile vitezei de respirație observate nu pot fi totdeauna puse pe seama formării și acumulării OAA în sistem. Capacitatea OAA de a inhiba respirația depinde de gradul de cuplare a fosforilării de respirație, de prezența ATP și a ionilor de fluor.

Prezentată la redacție
la 10 februarie 1964

Laboratorul de chimie biologică,
Facultatea de medicină,
București

BIBLIOGRAFIE

1. P. Borst, E. C. Slater, Biochim. Biophys. Acta, **48**, 362 (1961).
2. E. C. Slater, W. C. Hülsmann, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **47**, 1 109 (1961).
3. G. F. Azzone, L. Ernster, Nature, **187**, 65 (1960).
4. G. F. Azzone, L. Ernster, J. Biol. Chem., **236**, 1 518 (1961).
5. G. R. Williams, Canad. J. Biochem. Physiol., **39**, 103 (1961).

6. P. SCHOLLMEYER, M. KLINGENBERG, Biochem. Biophys. Res. Com., **4**, 43 (1961).
7. J. B. CHAPPELL, Biochem. J., **84**, 62 P (1962).
8. J. B. CHAPPELL, J. Biol. Chem., **238**, 410 (1963).
9. B. CHANCE, G. R. WILLIAMS, G. HOLLUNGER, J. Biol. Chem., **238**, 439 (1963).
10. E. CRISTEA, C. GURBAN, I. MITU, St. cerc. biochimie, **6**, *4*, 511 (1963).
11. E. A. JONES, H. GUTFREUND, Biochem. J., **87**, 639 (1963).
12. B. CHANCE, *Symposium on intracellular respiration, Fifth International Congress of Biochemistry, Moscow, 1961*, Londra, Pergamon Press, **5**, 3 (1963).
13. W. N. ALDRIDGE, Biochem. J., **67**, 423 (1957).
14. H. A. LARDY, H. WELLMAN, J. Biol. Chem., **195**, 215 (1952).
15. A. B. PARDEE, V. R. POTTER, J. Biol. Chem., **176**, 1 085 (1948).
16. D. B. TYLER, J. Biol. Chem., **216**, 395 (1955).
17. B. CHANCE, G. HOLLUNGER, Nature, **185**, 666 (1960).
18. B. CHANCE, B. HAGIHARA, J. Biol. Chem., **237**, 3 540 (1962).
19. J. B. CHAPPELL, Federation Proc., **20**, 50 (1961).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, p. 183–190, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

DOZAREA GLUCIDELOR ÎN LICHIDELE BIOLOGICE PRIN REACȚIA CU *o*-TOLUIDINĂ

DE

STELA GHEȚIE și EMILIA TRIPCOVICI

Rezumat. — S-a îmbunătățit metoda de determinare a glucozei din lichidele biologice prin reacția cu *o*-toluidină. Modificarea raportului dintre reactivi a permis elaborarea unui protocol unic de lucru pentru ser, lichid cefalorahidian și urină: 0,3 ml lichid biologic se deproteinizează cu 1,7 ml acid tricloracetic 3%, iar la 1 ml filtrat se adaugă 4 ml soluție 6% de *o*-toluidină în acid acetic glacial care conține 1% tiouree.

Determinarea glicemiei s-a făcut pe ser; nu se recomandă folosirea fluorurii de sodiu ca anticoagulant, întrucît aceasta modifică rezultatele reale. Dozarea glucozei trebuie să fie făcută în filtratul liber de proteină.

S-a găsit că metoda cu *o*-toluidină este mai specifică decît metodele care folosesc reacții de oxidoreducere. Pentozele dau reacție specifică cu *o*-toluidina și dezvoltă la cald culoarea roșie.

Valorile normale în metoda cu *o*-toluidină sînt cuprinse între 0,70 și 1,10 $g^0/_{00}$ pentru glicemie, iar glicorahia normală oscilează între 0,40 și 0,80 $g^0/_{00}$.

Metodele clasice de dozare a glucidelor folosesc proprietatea acestora de a fi substanțe reducătoare. Pentru a se îndepărta din practica laboratorului clinic metodele reducătoare nespecifice, s-a încercat înlocuirea lor. Astfel Hultman [1] a găsit că, dintre aminele aromatice, *o*-toluidina dă o reacție de culoare caracteristică cu aldozele și cetozele. Autorul a arătat că se poate lucra nu numai cu sînge total, ci și cu ser sau plasmă, în care caz deproteinizarea nu mai este necesară. Deoarece reacția este sensibilă la apă, concentrația finală a acesteia în amestec nu trebuie să depășească 10%. Curba de absorbție pentru glucoză prezintă două maxime, dintre care una, mai pronunțată, la 625 mμ. S-a arătat de asemenea că galactoza reacționează cu reactivul de *o*-toluidină în mod analog cu glucoza, iar fructoza dezvoltă cu *o*-toluidina o culoare cu intensitate mai slabă.

Dubovski [2] a făcut un studiu asupra unor condiții de lucru în tehnica de determinare a glucozei în lichidele biologice prin reacția cu *o*-toluidină. Acest autor a presupus că aminele aromatice, în soluție de

acid acetic glacial, condensîndu-se cu glucoza la cald, determină formarea unui produs colorat, iar acest produs este un amestec de glicozilamină ⇌ bază Schiff. Autorul a constatat că glucoza dezvoltă cu *o*-toluidina o culoare verde-albastră, iar curba de etalonare pentru glucoză este proporțională pînă la 300 mg%, precum și că manoza și galactoza reacționează cu *o*-toluidina ca și glucoza, pe cînd fructoza, glucozamina, maltoza etc. nu dau această reacție. K. M. Dubovski a stabilit intervalul normal pentru glicemie între 70—120 mg%, iar pentru glicorahie între 50 și 80 mg%.

Hyvärinen și Nikkila [3] au reluat tehnica lui E. Hultman și i-au adus unele îmbunătățiri. Pentru a corecta erorile dependente de puritatea reactivilor, ei au adăugat soluției acetice de *o*-toluidină 0,15 g% tiouree.

Noi am încercat să reproducem experiențele acestor autori, cu respectarea parametrilor recomandați în literatură, dar rezultatele obținute nu ne-au dat satisfacție. Totodată unele aspecte ale problemei nu erau suficient lămurite și anume :

1. Se aplică tehnici de lucru diferite și se folosesc reactivi diferiți pentru fiecare lichid biologic în parte.

2. Nu reiese clar dacă determinarea glicemiei trebuie făcută pe ser sau pe sînge total.

3. Nu este lămurită importanța și necesitatea deproteinizării prealabile a lichidului biologic cercetat.

4. Există rezultate contradictorii cu privire la specificitatea reacției.

5. Raportul dintre reactivi și probă, recomandat în literatură, duce la un produs slab colorat.

6. Mecanismul de reacție care determină apariția culorii este nesatisfăcător explicat.

În lucrarea de față ne-am propus elucidarea acestor chestiuni.

MATERIAL ȘI METODĂ

Reactivi :

a) Soluție de acid tricloracetic 3%.

b) Soluție de *o*-toluidină 6% în acid acetic glacial, care conține 1% tiouree. Reactivul se prepară cu distilatul obținut din produsul comercial la 198—200 °C. Distilatul, slab galben, se păstrează bine la rece. Reactivul se prepară cu 24 de ore înainte de utilizare și trebuie să fie incolor. Tioureea adăugată stabilizează reactivul și produce anularea culorii galbene care se dezvoltă în momentul preparării. S-a ridicat concentrația în tiouree, deoarece puritatea acidului acetic glacial folosit era relativă. Adaosul sporit de tiouree blochează reacția parazitară dată cu *o*-toluidină de aldehida acetică ce impurifică acidul acetic glacial.

c) Soluție standard de glucoză 3 g ‰ în acid benzoic 0,2 g %.

Tehnica. 0,3 ml lichid biologic (ser, lichid cefalorahidian, urină)[1] se defecă cu 1,7 ml acid tricloracetic (a). După 5 min. se filtrează printr-un filtru mic, într-o eprubetă gradată, iar la 1 ml filtrat se adaugă 4 ml reactiv (b). Se ține 8 min în baia de apă la fierbere. Se răcește brusc și se citește după maximum 30 min la fotometrul Pulfrich. Citirea se face față de apă distilată, la 610 mμ, în cuva cu drum optic de 1 cm. Martorul reactivilor nu dă extincție. Curba etalon pentru glucoză (fig. 1) se trasează procedînd identic, cu probe care conțin cantități diferite de glucoză. Intervalul de concentrație în glucoză pentru care se respectă legea lui Lambert și Beer este destul de mare (0,10—3 g ‰). Curba

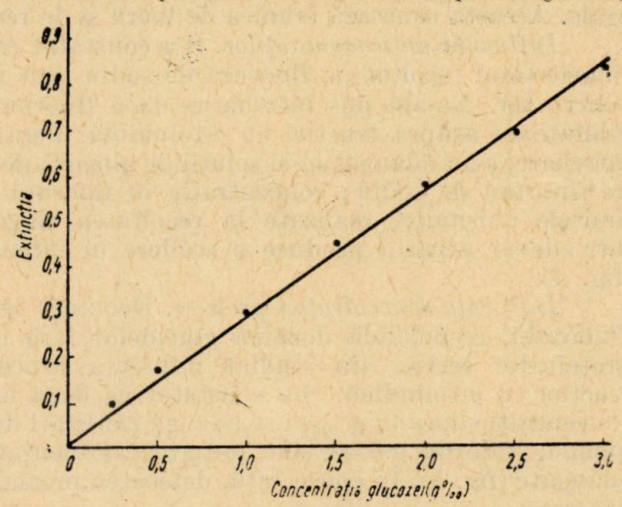


Fig. 1. — Curba de etalonare pentru glucoză.

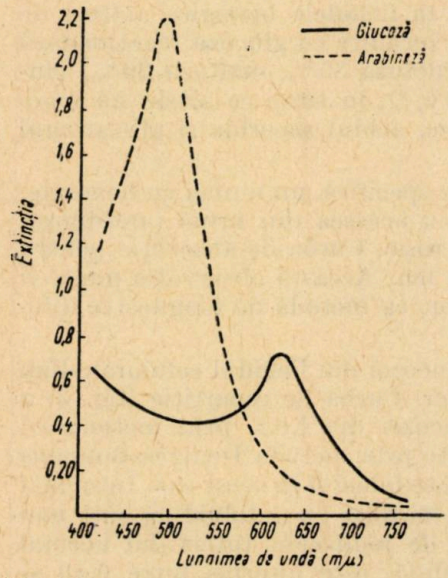


Fig. 2. — Curba de absorbție pentru glucoză și arabinoză.

de absorbție pentru glucoză prezintă două maxime, dintre care una la 420 mμ și cealaltă, mai pronunțată, la 610 mμ (fig. 2).

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Determinarea glicemiei. Pentru determinarea glicemiei s-a lucrat cu ser, iar valorile găsite prin metoda cu *o*-toluidină au fost comparate cu cele furnizate de metoda Hagedorn-Jensen [4]. Din figura 3 se vede că valorile determinate prin metoda cu *o*-toluidină sînt mai mici decît cele obținute prin metoda Hagedorn-Jensen, deoarece *o*-toluidina reacționează numai cu hexozele. Valorile normale ale glicemiei, determinate prin metoda cu *o*-toluidină, sînt cuprinse între 0,70 și 1,10 g‰.

[1] Deoarece în urina diabeticilor concentrația de glucoză depășește adeseori 3 g‰, este necesar ca produsul de reacție colorat să se dilueze cu un volum corespunzător de acid acetic glacial, pînă cînd intensitatea culorii intră în limitele de calibrare; la calcul se ține seama de diluție. În cazul cînd intensitatea obținută după reacție este mult prea mare, se poate dilua urina chiar înainte de prelucrare.

Pentru dozarea glicemiei s-a folosit ser în loc de sînge total, întrucît valorile găsite pentru ser și sînge total, fără anticoagulant, sînt sensibil egale. Aceasta ușurează tehnica de lucru și de recoltare a sîngelui.

Influența anticoagulanților. S-a constatat că valorile obținute pentru sîngele total recoltat pe fluorură de sodiu sînt mai mici decît cele găsite pentru ser. Ne-am pus întrebarea dacă fluorura de sodiu are o acțiune inhibitoare asupra reacției cu *o*-toluidină. Pentru a răspunde la această întrebare, s-au adăugat unei soluții de glucoză de 2,5 g‰ diferite cantități de fluorură de sodiu; concentrația în fluorură de sodiu s-a încadrat în limitele obișnuite, realizate la recoltarea sîngelui, și s-a constatat că într-adevăr aceasta produce o scădere în intensitatea culorii de reacție (fig. 4).

Influența concentrației proteice. Deoarece Hultman, spre deosebire de Dubovski, recomandă dozarea glucidelor fără îndepărtarea prealabilă a proteinelor serice, am studiat influența concentrației proteice asupra reacției cu *o*-toluidină. S-a constatat că dacă unei soluții de glucoză de concentrație dată (2 g‰) i se adaugă cantități diferite de serum-albumină umană, valorile găsite sînt puternic influențate de prezența proteinei adăugate (fig. 5). În consecință, defecarea prealabilă a serului este absolut necesară.

Specificitatea reacției. S-a studiat reacția pe care ar putea-o da cu *o*-toluidina unele substanțe ce se găsesc în lichidele biologice alături de glucoză. S-a constatat că unele substanțe înrudite cu glucoza reacționează într-o măsură oarecare cu *o*-toluidina (fructoza 35%, maltoza 20%, glucozo-*6*-fosfatul 15%, glucozo-*1*-fosfatul 9% [2]), în timp ce altele nu reacționează cu *o*-toluidina (ureea, acidul uric, acidul ascorbic și glutationul redus).

Reactivul de *o*-toluidină dă o reacție specifică nu numai cu hexozele, ci și cu pentozele. Culoarea dezvoltată cu acestea din urmă (arabinoză, xiloză) în condițiile descrise mai sus este roșie. Curba de absorbție pentru pentoze prezintă un singur maxim la 500 mμ. Această observație poate fi exploatată în folosul practicii de laborator, ca metodă de diagnostic diferențial în cazul unor pentozurii.

Determinarea glicorahiei. Dozarea glucozei din lichidul cefalorahidian s-a făcut în aceleași condiții ca pentru ser. Curba de repartiție (fig. 3) a datelor paralele obținute la dozarea glucozei din l.c.r. prin metoda cu *o*-toluidină, comparativ cu cele înregistrate prin metoda Denigès-Bonnans [5], arată că reactivul cu *o*-toluidină se poate folosi și în acest caz. Întocmai ca și la ser, și aici valorile furnizate de metoda cu *o*-toluidină sînt mai scăzute decît cele obținute prin metoda de reducere. Intervalul normal pentru glicorahie, în metoda cu *o*-toluidină, este cuprins între 0,40 și 0,80 g‰.

Determinarea glicozuriei. Curba de repartiție (fig. 3) înfățișează rezultatele obținute prin metoda cu *o*-toluidină, comparativ cu cele date

[2] S-au preparat soluții 3 g‰ din diferitele substanțe cercetate și s-a apreciat aportul lor la reacția cu *o*-toluidină calculîndu-l în procente față de extincția dată de aceeași concentrație de glucoză.

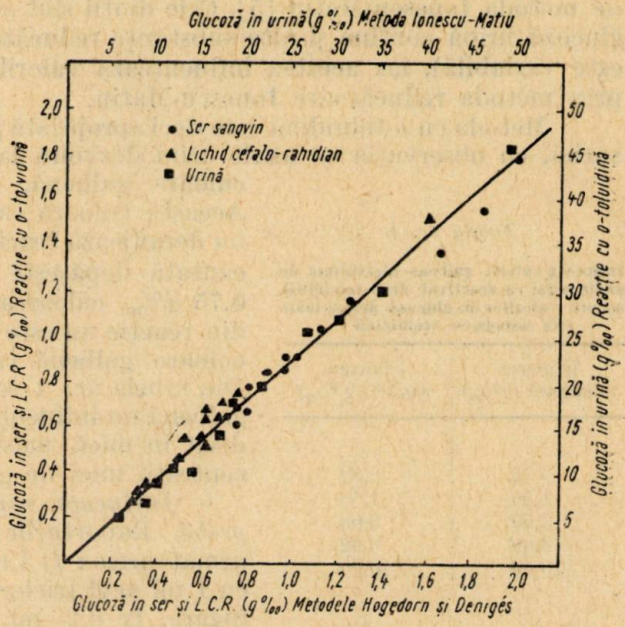


Fig. 3. — Corespondența dintre metodele clasice de dozare a glucozei în lichidele biologice și reacția cu *o*-toluidină.

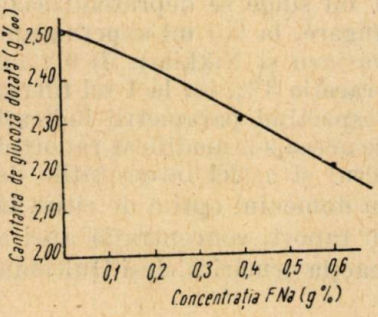


Fig. 4. — Influența concentrației de fluorură de sodiu asupra reacției glucozei cu *o*-toluidina. Concentrația glucozei, 2,5 g %₀.

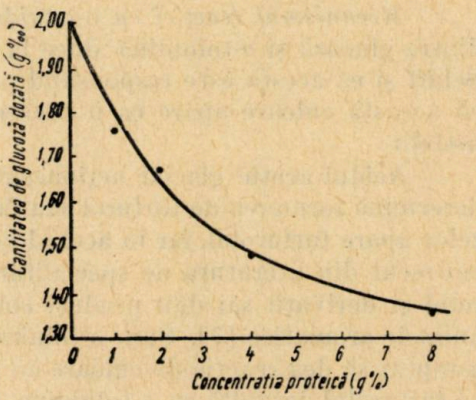


Fig. 5. — Influența concentrației proteice asupra reacției glucozei cu *o*-toluidina. Concentrația glucozei, 2,0 g %₀.

de metoda Ionescu-Matiu [5]. Cele dintîi sînt și aici mai mici; alături de glucoză urina conține și alte substanțe reducătoare (a căror concentrație este variabilă), iar acestea influențează valorile de glucoză determinate prin metoda reducătoare Ionescu-Matiu.

Metoda cu *o*-toluidină este deci apropriată pentru determinarea glicozuriei, cu observația că unele urini dezvoltă la fierbere cu *o*-toluidina o culoare galbenă, de intensitate variabilă. Această culoare care apare în unele cazuri nu deranjează reacția, întrucît dacă glucoza căutată depășește în urină concentrația de 0,75 g‰, culoarea verde-albastră rezultată din reacție nu este influențată de eventuala culoare galbenă care s-ar dezvolta paralel. Din tabela nr. 1 se vede că această culoare galbenă nu influențează rezultatele glicozuriei decît în mică măsură și numai pentru concentrații mici de glucoză.

Tabela nr. 1

Influența culorii galbene (dezvoltată de unele urini cu reactivul de *o*-toluidină) asupra valorilor de glucoză determinate prin metoda cu *o*-toluidină

Glucoza adăugată (g‰)	Glucoza găsită (g‰)
—	—
0,75	0,82
1,50	1,56
3,00	3,06
6,00	6,02
10,00	10,00

Influența raportului dintre reactivi și probă. Raporturile găsite în literatură sînt următoarele: *1*) 1 ml sînge se deproteinizează cu 1 ml acid tricloracetic 3%. După centrifugare, la 0,2 ml supernatant se adaugă 3 ml reactiv cu *o*-toluidină (Hultman). *2*) 1 ml sînge se deproteinizează cu 1 ml acid tricloracetic 3%. După centrifugare, la 0,5 ml supernatant se adaugă 3 ml reactiv cu *o*-toluidină (Hyvärinen și Nikkila). *3*) 0,2 ml sînge se deproteinizează cu 1,8 ml acid tricloracetic 3%, iar la 1 ml filtrat se adaugă 3 ml de *o*-toluidină (Dubovski). Respectînd parametrii indicați mai sus, s-au obținut produși slab colorați. De aceea s-a modificat raportul dintre reactiv și probă (vezi tehnica de lucru) și astfel intensitățile de culoare obținute au dat o extincție plasată în domeniul optim de citire la fotometrul Pulfrich. Prin modificarea acestui raport, concentrația apei a crescut la 20%, dar acest fapt nu a deranjat reacția urmărită, deși Hultman recomandă ca ea să nu depășească 10%.

Mecanismul reacției cu o-toluidina. Dubovski a presupus că reacția dintre glucoză și *o*-toluidină duce la un amestec de glicozilamină și bază Schiff și că acesta este responsabil pentru culoare. Noi am presupus însă că această culoare apare ca o consecință a unor reacții ce se desfășoară astfel:

Acidul acetic glacial acționează la cald asupra monozaharidelor și determină formarea de furfurol sau de derivați ai acestuia (în cazul pentozelor apare furfurolul, iar în acel al hexozelor hidroximetilfurfurolul), fapt cunoscut din literatura de specialitate [6]. Se știe de asemenea că furfurolul și derivații săi dau produși colorați, prin reacții de condensare cu aminele aromatice [7]. Cum *o*-toluidina este o amină aromatică, este de așteptat să dea reacție de culoare cu furfurolul. Într-adevăr, am constatat că furfurolul dezvoltă cu *o*-toluidina, la rece și instantaneu, o culoare roșie.

Pentozele dau aceeași culoare numai după fierbere în mediu de acid acetic glacial în prezența *o*-toluidinei. Acidul acetic glacial determină la cald apariția furfurolului și, pe măsură ce reacția înaintează, apare culoarea caracteristică. Acest fapt explică nevoia unui timp determinat de fierbere. În cazul hexozelor reacția se petrece în mod asemănător, cu deosebirea că hidroximetilfurfurolul dă cu *o*-toluidina o culoare verde-albastră. Astfel se explică de ce și substanțele înrudite cu glucoza dau reacție cu *o*-toluidina. În favoarea mecanismului de reacție propus de noi pledează și faptul, constatat de Dubovski, că glucozamina nu reacționează la cald cu *o*-toluidina. Această comportare este determinată de gruparea aminică legată de carbonul 2, care nu permite formarea hidroximetilfurfurolului, și deci reacția de culoare cu *o*-toluidina.

Rezultatele noastre au confirmat pe cele din literatură în ce privește dozarea glucozei în lichidele biologice prin metoda cu *o*-toluidină. Modificările pe care le-am adus tehnicii de lucru înlătură inconvenientele care ne-au determinat să întreprindem acest studiu.

CONCLUZII

1. S-a elaborat un protocol de lucru unic pentru toate lichidele biologice (ser, lichid cefalorahidian, urină).

2. Pentru dozarea glicemiei se folosește ser sanguin, ceea ce ușurează tehnica de lucru și de recoltare a sîngelui.

3. Nu se recomandă folosirea fluorurii de sodiu ca anticoagulant, deoarece produce scăderea intensității culorii.

4. Concentrația proteică a serului sanguin influențează valorile de glucoză, ceea ce obligă la deproteinizarea prealabilă.

5. Dintre substanțele care pot exista în mod fiziologic alături de glucoză în lichidele biologice, cele înrudite cu ea (maltoza, fructoza, glucozo-*1*-fosfatul, glucozo-*6*-fosfatul) participă într-o anumită măsură la reacție, în timp ce altele sînt nereacționabile (ureea, acidul uric, acidul ascorbic, glutationul redus).

Pentozele dau reacție specifică cu *o*-toluidina.

6. Modificarea raportului dintre reactiv și proba de cercetat a dus la produși intens colorați.

7. Valorile normale în metoda cu *o*-toluidină, rezultate din experiențele efectuate, oscilează în intervalul 0,70—1,10 g‰ pentru glicemie, iar pentru glicorahie între 0,40 și 0,80 g‰.

Primită la redacție
la 15 noiembrie 1963

Laboratorul de biochimie al Spitalului clinic de pediatrie „Emilia Irsa", București

BIBLIOGRAFIE

1. E. Hultman, Nature, **183**, *4654*, 108 (1958).
2. K. M. Dubovski, Clin. chem., **8**, *3*, 215 (1962).
3. A. Hyvärinen, E. A. Nikkila, Clin. chim. Acta, **7**, *1*, 140 (1962).
4. H. C. Hagedorn, B. N. Jensen, Biochem. Z., **137**, 92 (1923).
5. P. Georgescu, E. Păunescu, *Metode biochimice de diagnostic și cercetare*, București, Edit. medicală, 1960, p. 226 și p. 228.
6. S. P. Colowick, N. O. Kaplan, *Methods in Enzymology*, New York, Acad. Press, 1957, v. III, p. 100.
7. C. D. Nenitescu, *Tratat de chimie organică*, București, Edit. tehnică, 1958, v. II, p. 595.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 191–194, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

MICRODOZARE DE IOD ÎN PLANTE

DE

S. GOGĂLNICEANU, A. CIOFU și R. CHIRILĂ

Rezumat. — Autorii propun aplicarea la analiza iodului din plante a metodei Skopințev de microdeterminare a iodului în substanțe anorganice, adaptată de autori pentru substanțele organice.

S-au făcut determinări de iod în plante obținute pe soluri tratate cu săruri de iod, precum și pe plante crescute pe soluri care nu au fost tratate cu săruri de iod.

Rezultatele obținute de autori arată că abaterile constatate în determinările paralele nu depășesc limita erorilor obișnuite. Metoda propusă este o metodă expeditivă și sensibilă, putîndu-se doza cantități minime de iod pînă la 2—3 μg, cu o precizie mare.

În prezenta descriem modul cum poate fi aplicată la analiza plantelor metoda lui Skopințev [2] de microdeterminare a iodului în substanțele anorganice, adaptată de noi pentru substanțele organice [1].

Procedeul de lucru. Din proba în prealabil uscată, apoi mărunțită și omogenizată, se introduce într-o capsulă de porțelan o cantitate precis cîntărită (între 5 și 30 g), în funcție de conținutul de iod (vezi pentru orientare tabelele de mai jos), care apoi se îmbibă cu 5—10 ml soluție saturată de K_2CO_3 și 10 ml alcool etilic. Se aprinde alcoolul etilic, apoi se calcinează proba la un bec din ce în ce mai puternic, la urmă calcinarea făcîndu-se în cuptorul electric la 550—600°, pînă la dispariția completă a carbonului.

Cenușa este reluată cu 10 ml apă distilată și se evaporă la sec pe baie cu apă, uscîndu-se apoi 2 ore la 105° în etuvă.

Reziduul se tratează cu alcool etilic, extrăgîndu-se în acest mod iodul, sub formă de iodură de potasiu. Extracțiile se repetă de 8—10 ori, cu cîte 3—5 ml alcool. Extractul alcoolic este prins într-un Erlenmayer de circa 100 ml cu dop. Extractul alcoolic se evaporă pe baie cu apă pînă la sec. Reziduul se dizolvă în 5 ml apă. În soluție se adaugă 0,2 g clorură de amoniu și 2 ml soluție de acid acetic 1 N, se fierbe 5 minute, pentru descompunerea azotaților, a căror prezență duce la erori de titrare.

După îndepărtarea azotaților, în probă se adaugă 0,5 ml soluție de acid sulfuric 0,5 N și 3—4 picături de apă de brom proaspăt preparată. Se fierbe 1 minut. Pentru îndepărtarea urmelor de brom se adaugă 0,5 ml soluție saturată de fenol. După răcire se adaugă 0,1—0,3 ml soluție de iodură de potasiu 2% și după 3—5 minute se titrează iodul pus în libertate cu soluție de tiosulfat de sodiu 0,002 N, 0,001 N sau 0,0001 N, în prezență de amidon.

Tabela nr. 1

Planta analizată	Cantit. de substanță luată în analiză	$Na_2S_2O_3$		µg iod găsit în probă	µg iod calc. la 100 g	Media	Diferența față de proba medie
		normalitate	folosit ml				
			Plante neiodate				
Ovăz	6,7110	0,0001	0,11	0,232	3,82		—0,03
	6,6048	0,0001	0,11	0,232	3,88	3,85	+0,03
Porumb	13,2800	0,0001	0,39	0,824	6,20		+0,03
	13,2626	0,0001	0,39	0,824	6,22		+0,05
	22,4209	0,0001	0,65	1,374	6,12	6,17	—0,05
	28,4871	0,0001	0,83	1,755	6,16		—0,01
	19,5002	0,0001	0,57	1,205	6,17		0
Mazăre	7,1268	0,0001	0,40	0,8460	11,8		—0,2
	7,4140	0,0001	0,40	0,8460	11,4	11,6	—0,2
Năut	23,9940	0,0001	0,42	0,888	3,70		—0,005
	29,6819	0,0001	0,52	1,10	3,71	3,705	+0,005
			Plante iodate				
Semințe							
Ovăz	5,6487	0,001	0,21	1,47	79,2		+0,65
	6,8304	0,001	0,25	5,32	77,9	78,55	—0,65
Porumb	11,0606	0,001	0,38	8,037	72,6		+0,3
	6,6792	0,001	0,23	4,864	72,8		+0,5
	22,2419	0,001	0,76	16,074	72,2	72,3	—0,1
	28,0650	0,001	0,96	20,30	72,3		0
	20,9464	0,001	0,71	15,016	71,6		—0,7
Mazăre	6,7324	0,001	0,12	2,538	37,6		—0,55
	7,6418	0,001	0,14	2,961	38,7	38,15	+0,55
Năut	29,1876	0,001	0,67	14,170	48,5		—0,6
	27,6159	0,001	0,65	13,747	49,7	49,1	+0,6
Păioase							
Paie de ovăz	7,6300	0,002	0,15	6,345	83,1		—1,03
	7,9264	0,002	0,16	6,768	85,3	84,13	+1,17
	10,5696	0,002	0,21	8,883	84,0		—0,13
Lucernă coasa I	26,8328	0,002	0,54	22,842	85,1		+0,3
	21,5150	0,002	0,43	18,189	84,5	84,8	—0,3
Lucernă coasa II	26,9806	0,002	0,35	14,805	54,8		—0,2
	23,7424	0,002	0,31	13,113	55,2	55,0	+0,2
Coceni de porumb	14,1512	0,002	0,24	10,150	71,80		—0,51
	18,7900	0,002	0,32	13,536	72,03	72,31	+0,28
	17,9324	0,002	0,31	13,113	73,1		+0,78

CONSIDERAȚII ASUPRA REZULTATELOR OBȚINUTE

Încercările noastre în lucrarea de față s-au făcut cu plante obținute pe soluri care au fost tratate cu săruri de iod (plante iodate), precum și cu plante crescute pe soluri obișnuite (plante neiodate).

Rezultatele analizelor sînt date în tabela nr. 1.

În concluzie, rezultatele înscrise în această tabelă arată că abaterile constatate în determinările paralele nu depășesc limitele erorilor obișnuite.

Prezentată la redacție
la 26 septembrie 1963

Institutul agronomic „N. Bălcescu"
București

BIBLIOGRAFIE

1. GOGĂLNICEANU S., CIOFU A., *Adaptarea metodei Skopințev la determinarea iodului din substanțe organice*, Lucrări științifice, seria a VI-a, Inst. Agronomic „N. Bălcescu", București, 1963, p. 305.
2. KORENMAN I., *Microanaliza chimică cantitativă*, București, Editura tehnică, 1951.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 195–204, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

ROLUL EXCITAȚIILOR ȘI EFORTULUI MECANIC ÎN DESCOMPUNEREA FOSFAGENULUI DIN MUȘCHI ÎN DIFERITE STĂRI DE EXCITABILITATE

DE

CORINA IORDACHE

Rezumat. — Rezultatele experimentale obținute în lucrarea de față aduc noi dovezi în sprijinul concluziilor publicate anterior, și anume că descompunerea fosfagenului este provocată de excitații și că descompunerea fosfagenului și exercitarea efortului mecanic sînt două fenomene independente.

S-a constatat că la mușchiul normal sau curarizat, *in situ* sau izolat, supus acțiunii excitațiilor electrice directe în condiții de izotonie și fără exercitarea efortului mecanic, fosfagenul se descompune în funcție de numărul de excitații primite de către mușchi, și anume cu atît mai mult, cu cît numărul de excitații crește. Descompunerea masivă de fosfagen are loc în cursul acțiunii primelor 50 de excitații și nu este influențată de scăderea excitabilității mușchiului prin curarizare.

S-a constatat că are loc aceeași descompunere de fosfagen fie că mușchiul se contractă sub acțiunea excitațiilor fără exercitarea efortului mecanic, fie că el se contractă sub acțiunea excitațiilor cu exercitarea efortului mecanic, independent de gradul de excitabilitate a mușchiului.

Într-o serie de lucrări [1—3], Nachmansohn a stabilit că între efortul mecanic exercitat de mușchi și descompunerea fosfagenului muscular ar exista o corelație, iar între conținutul de fosfagen al mușchiului și excitabilitate ar exista un paralelism. Reluînd cercetarea relațiilor dintre excitabilitatea musculară și fosfagen stabilite de Nachmansohn, dar în condiții cît mai apropiate de cele în care se desfășoară curent activitatea musculară [4], s-a ajuns la constatarea că descompunerea fosfagenului nu este condiționată de efortul mecanic depus de mușchi, ci de excitațiile primite, iar între nivelul fosfagenului și gradul de excitabilitate al unuia și aceluiași mușchi nu există interdependență.

Deoarece concluziile lui Nachmansohn se deosebeau de aceste constatări, s-a analizat într-o lucrare publicată anterior [5] cauza acestor discordanțe. Astfel, s-a arătat că nepotrivirile menționate provin din

faptul că interpretarea datelor experimentale s-a făcut pe baze diferite. Nachmansohn a recurs la valorile coeficienților izometrici, pe cînd noi am recurs la cantitățile de fosfagen descompus. Reinterpretînd datele experimentale publicate de Nachmansohn pe baza cantităților de fosfagen descompus și comparînd concluziile astfel obținute cu concluziile noastre, s-a confirmat constatarea anterioară că excitațiile ca atare sînt cele care acționează asupra nivelului fosfagenului și fac ca acest nivel să scadă cu numărul și puterea excitațiilor, indiferent dacă cu această ocazie mușchiul execută efortul sau nu.

În lucrarea de față se aduc noi dovezi experimentale în sprijinul concluziilor noastre amintite mai sus. Astfel, în cazul afirmației că descompunerea fosfagenului este condiționată de excitațiile primite de către mușchi, indiferent de starea lui de excitabilitate, am considerat necesar să examinăm descompunerea fosfagenului în mușchiul supus acțiunii unui număr diferit de excitații. Aceasta deoarece în experiențele noastre [4] excitarea mușchiului dura mult, creindu-se o stare de oboseală înaintată, stare care nu era întotdeauna realizată în cercetările lui D. Nachmansohn. Pentru a aduce noi argumente experimentale în sprijinul afirmației noastre că descompunerea fosfagenului nu este condiționată de efortul mecanic exercitat de mușchi, independent de gradul lui de excitabilitate, am considerat necesar să cercetăm descompunerea fosfagenului din mușchiul care se contractă izotonic cu exercitarea efortului mecanic.

Pentru cercetarea acestor două aspecte s-a lucrat pe mușchii gastrocnemieni de broască, în stare normală sau curarizată, atît *in situ* cît și izolați. Mușchii proveneau de la broaște întregi, nedecapitate, cu măduva spinării intactă și asupra cărora nu s-a acționat cu nici un agent fizic sau chimic. S-au respectat condițiile experimentale folosite în lucrarea menționată [4]. Broaștele (*Rana ridibunda*) au fost capturate în jurul Bucureștiului, în perioada martie—decembrie 1963. Determinările de fosfagen s-au făcut la temperatura camerei de aprox. +20°C, pe loturi de cîte 8 broaște, comparîndu-se fie valorile de fosfagen descompus în mușchii simetrici ai aceluiași animal — dintre care unul a fost supus experimentării, iar celălalt a servit drept martor în repaus —, fie valorile de fosfagen descompus la mușchii unui lot de broaște față de mușchii altui lot. Rezultatele determinărilor de fosfagen au fost supuse analizei variantei.

Pentru excitarea electrică directă s-a folosit un cronaximetru TuR RS 3, adaptat de noi pentru cercetări pe animale, prin conectarea la bornele de ieșire ale aparatului a unui sistem de rezistențe [4]. Excitația s-a realizat cu ajutorul unui tren de impulsuri rectangulare, cu o frecvență de aproximativ 40 imp./minut și o intensitate de 5—6 mA. S-au folosit electrozi din fir de argint clorurat, înfășurați direct pe piciorul drept al animalului, la nivelul extremităților mușchiului gastrocnemian; în cazul mușchiului izolat, electrozii s-au aplicat la extremitățile lui.

Pentru curarizare s-a injectat în sacul dorsal limfatic al broaștei 1 ml soluție de flaxedil $2^0/_{00}$, experimentîndu-se după 1—2 ore, atunci cînd relaxarea era profundă și efectul de redresare complet suprimat.

Efortul mecanic s-a realizat *in situ*, prin legarea de laba piciorului drept, a unor greutăți, iar în cazul mușchiului izolat, prin fixarea lui la un miograf de care se suspendau și greutățile respective.

Imediat după experimentare s-au tăiat picioarele și s-au aruncat în aer lichid. Mușchii gastrocnemieni înghețați s-au mojarat apoi în aer lichid pînă la obținerea unui praf fin. Dozarea fosfagenului s-a făcut în extractul tricloracetic, ca și în lucrările anterioare [4], după metoda lui Fiske și Subbarow [6], modificată de Lohmann [7] pentru extractul muscular.

În lucrările precedente [4], [8] am menționat că valorile fosfagenului care se obțin în cazul mușchilor simetrici ai aceluiași animal în repaus sînt concordante între ele. Această constatare ne permite să apreciem cantitatea de fosfagen descompus într-un mușchi supus acțiunii excitațiilor sau exercitării efortului mecanic, față de celălalt mușchi simetric, care se află în repaus.

Pentru a cerceta dacă se constată o descompunere de fosfagen în cazul unui număr diferit de excitații electrice directe, care nu obosesc excesiv mușchiul, indiferent de starea lui de excitabilitate, am determinat fosfagenul din mușchiul normal sau curarizat, *in situ* sau izolat, sub acțiunea unor serii de 10, 25, 50 și 100 de excitații electrice directe, fără exercitarea efortului mecanic. Deoarece s-a constatat că excitațiile de scurtă durată (1 secundă) nu se repercutează asupra nivelului de fosfagen muscular (8), am început cu efectul produs în urma a 10 excitații (durată totală 15 secunde). Ne-am oprit la acțiunea a 100 de excitații (durată totală 150 de secunde), deoarece s-a arătat că se constată aceeași scădere de fosfagen dacă mușchiul primește 600 de excitații în 10 minute, sau 120 de excitații în 2 minute [4].

După cum se constată din tabela nr. 1, la mușchiul gastrocnemian normal sau curarizat, *in situ* sau izolat, supus acțiunii excitațiilor electrice

Tabela nr. 1

Descompunerea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian de broască *(Rana ridibunda)* **normal și curarizat, supus în condiții de izotonie,** *in situ* **și izolat, excitațiilor electrice directe, succesive, fără exercitarea efortului mecanic** (mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt)

Nr. crt.	Nr. excitații	Mușchi *in situ*		Mușchi izolat	
		normal	curarizat	normal	curarizat
1	10	0,21	0,42	0,24	0,36
2	25	0,44	0,70	0,55	0,53
3	50	0,78	0,81	0,68	0,73
4	100	1,04	1,18	0,87	1,12
$F_{(0,05)} = 2,95$		$F_{exp.} = 24,31$ $D_{(0,05)} = 0,04$	$F_{exp.} = 9,49$ $D_{(0,05)} = 0,08$	$F_{exp.} = 8,35$ $D_{(0,05)} = 0,07$	$F_{exp.} = 17,88$ $D_{(0,05)} = 0,05$

directe, în condiții de izotonie și fără exercitarea efortului mecanic, față de mușchiul simetric în repaus, fosfagenul se descompune în funcție de numărul de excitații primite de mușchi, și anume cu atît mai mult, cu cît acest număr crește. În tabelă sînt date valorile medii de fosfagen descompus, exprimate în mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt, și diferențele-limită semnificative între mediile rezultatelor obținute pe loturi de cîte 8 broaște.

Aceste rezultate privind acțiunea excitațiilor asupra descompunerii fosfagenului din mușchi confirmă constatările lui Maréchal și Mommaerts [9], care, pe mușchiul intoxicat cu acid monoiodacetic, în tetanus izometric, au arătat că scindarea fosfocreatinei crește cu durata stimulării, precum și pe acelea ale lui Maréchal și Bleukx [10], care, în contracția izometrică, ajung la concluzia că hidroliza fosfocreatinei depinde de durata globală de tetanizare și de numărul tetanusurilor.

Din experiențele noastre se mai observă că la mușchiul curarizat, *in situ* sau izolat, cantitatea de fosfagen care se descompune, mai ales în cursul primelor 10—25 de excitații, este ceva mai mare decît în cazul mușchiului normal *in situ*. Aceasta se explică, probabil, prin faptul că la mușchiul curarizat, lipsit de intervenția excitațiilor nervoase naturale, nivelul fosfagenului este mai ridicat decît la mușchiul normal *in situ*, așa cum s-a arătat într-o lucrare anterioară [8], și, în consecință, mușchiul dispune inițial de o cantitate mai mare de fosfagen capabilă să se descompună.

Făcînd calculul cantităților de fosfagen descompus, exprimat în mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt/excitație, în cazul seriilor de 10, 25, 50 și 100 de excitații, se mai constată că pentru o singură excitație se descompune o cantitate mai mare de fosfagen atunci cînd mușchiul este supus acțiunii a 10 excitații decît atunci cînd el este supus acțiunii a 100 de excitații, independent de gradul său de excitabilitate (tabela nr. 2). Aceeași

Tabela nr. 2

Fosfagenul descompus, calculat pentru o singură excitație, în mușchiul gastrocnemian de broască *(Rana ridibunda)* **normal și curarizat, supus în condiții de izotonie,** ***in situ*** **și** ***izolat*****, seriilor de excitații electrice directe, succesive, fără exercitarea efortului mecanic**

(mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt)

Nr. crt.	Nr. excitații	Mușchi *in situ*		Mușchi izolat	
		normal	curarizat	normal	curarizat
1	10	$\frac{0,21}{10} = 0,021$	$\frac{0,42}{10} = 0,042$	$\frac{0,24}{10} = 0,024$	$\frac{0,36}{10} = 0,036$
2	25	$\frac{0,44}{25} = 0,017$	$\frac{0,70}{25} = 0,028$	$\frac{0,55}{25} = 0,022$	$\frac{0,53}{25} = 0,021$
3	50	$\frac{0,78}{50} = 0,015$	$\frac{0,81}{50} = 0,016$	$\frac{0,68}{50} = 0,013$	$\frac{0,73}{50} = 0,014$
4	100	$\frac{1,04}{100} = 0,010$	$\frac{1,18}{100} = 0,012$	$\frac{0,87}{100} = 0,009$	$\frac{1,12}{100} = 0,011$

constatare se desprinde și din determinarea acidului lactic, făcută de Tănăsescu [11] la mușchii normali *in situ* care au executat serii de 25, 50 și 100 de contracții. Aceste rezultate par să confirme afirmația lui Jendrassik și Faiszt [12], că sub acțiunea excitației electrice directe scin-

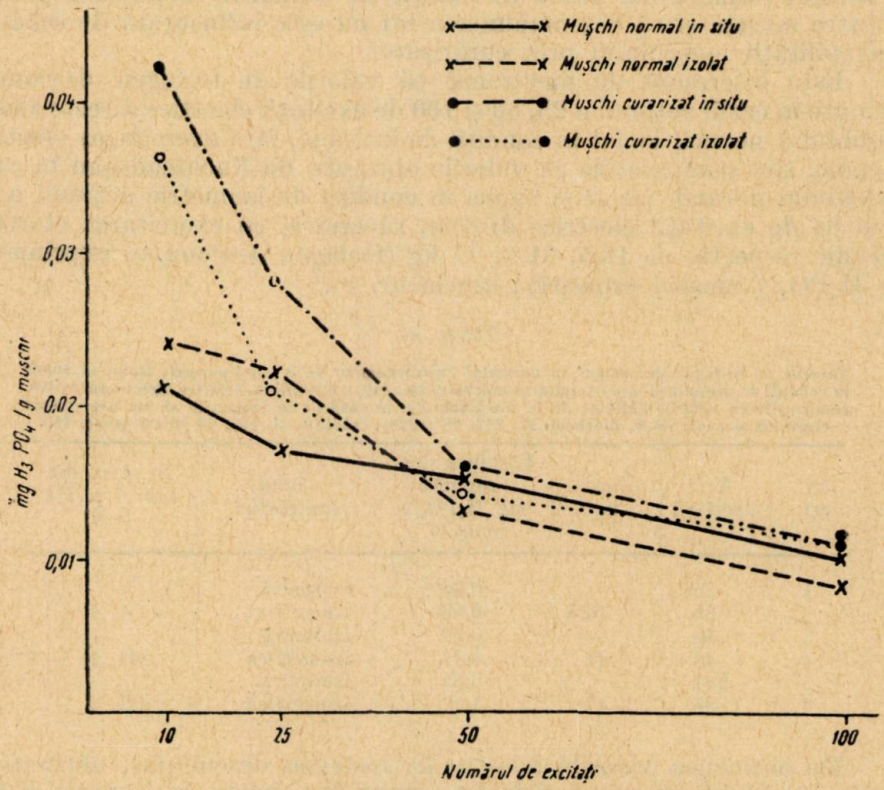


Fig. 1. — Fosfagenul descompus, calculat pentru o singură excitație, în mușchiul gastrocnemian de broască, normal sau curarizat, supus în condiții de izotonie, *in situ* și izolat, seriilor de excitații electrice directe, fără exercitarea efortului mecanic.

darea creatinfosfatului are loc mai repede, după un tetanos de 0,3—0,4 secunde sau după 3 contracții.

Reprezentînd grafic cifrele din tabela 2 se obține figura 1, din care se observă că fosfagenul se descompune în cea mai mare parte în cursul primelor 50 de excitații, curba descompunerii tinzînd asimptotic spre valori aproximativ constante. Menționăm că Carlson și Siger [13], în experiențele lor pe mușchi izolat, otrăvit cu acid monoiodacetic, au constatat o descompunere proporțională, liniară a fosfagenului, în funcție de numărul de excitații primit de către mușchi.

Se mai constată din analiza tabelei 2 și a fig. 1 că, începînd de la 50 de excitații în sus, cantitățile de fosfagen descompus din mușchii

curarizați se încadrează în cantitățile descompuse din mușchii normali, așezîndu-se pe aceeași curbă a variației fosfagenului descompus.

Toate aceste constatări, obținute din experiențele expuse mai sus, confirmă și întăresc încă o dată concluziile publicate anterior, și anume că nivelul fosfagenului scade în funcție de numărul excitațiilor primite de către mușchi și că descompunerea lui nu este influențată de scăderea excitabilității mușchiului prin curarizare.

Este interesant de menționat că valorile de fosfagen descompus obținute în cazul acțiunii a 25, 50 și 100 de excitații electrice directe asupra mușchiului normal izolat în condiții de izotonie, fără exercitarea efortului mecanic, sînt comparabile cu valorile obținute de Nachmansohn în cazul mușchiului normal, izolat și supus în condiții de izometrie acțiunii a 30, 42 și 88 de excitații electrice directe, succesive, cu exercitarea efortului mecanic respectiv de 16,5, 21 și 47 kg (fosfagen descompus exprimat în mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt; tabela nr. 3).

Tabela nr. 3

Valorile de fosfagen descompus în mușchiul gastrocnemian de broască normal, izolat și supus în condiții de izotonie și fără exercitarea efortului mecanic excitațiilor electrice directe, succesive, comparativ cu valorile obținute de D. Nachmansohn în condiții de izometrie și cu exercitarea efortului mecanic (D.N. Biochem. Z., 213, 28 (1929), tabela I, și 196, 79 (1928) tabela III)

Nr. crt.	Nr. excitații	Efort kg	Fosfagen descompus mg H_3PO_4/g mușchi	Felul contracției	Nr. exp. din tab. I și III D.N.
1	25	—	0,55	izotonică	—
2	30	16,5	0,66	izometrică	I, 4
3	50	—	0,68	izotonică	—
4	42	21	0,74	izometrică	III, 1
5	100	—	0,87	izotonică	—
6	88	47	1,12	izometrică	III, 2

De asemenea valorile noastre de fosfagen descompus, obținute în cazul mușchiului curarizat și izolat, supus în condiții de izotonie și fără exercitarea efortului mecanic acțiunii a 25, 50 și 100 de excitații electrice directe, succesive, sînt comparabile cu valorile de fosfagen descompus din experiențele publicate de Nachmansohn pe mușchi curarizat și izolat, supus acțiunii a 30, 63 și 100 de excitații electrice directe, succesive, în condiții de izometrie, cu efectuarea efortului mecanic respectiv de 12, 27 și 29 kg (fosfagen descompus exprimat în mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt; tabela 4).

Faptul că valorile obținute pe mușchiul care se contractă în condiții de izotonie sînt comparabile cu valorile obținute pe mușchiul care se contractă în condiții de izometrie vine să întărească concluziile noastre anterioare, că între fosfagen și efortul muscular nu există o legătură funcțională directă, aceeași scădere de fosfagen obținîndu-se în cazul excitării mușchiului cu sau fără exercitarea efortului mecanic.

Pentru a demonstra și pe altă cale experimentală că descompunerea fosfagenului nu este condiționată de efortul mecanic exercitat de mușchi,

independent de gradul lui de excitabilitate, am considerat necesar să comparăm valorile fosfagenului descompus la mușchiul excitat în condiții de izotonie și fără exercitarea efortului mecanic cu valorile de fosfagen descompus la mușchiul excitat în condiții de izotonie dar cu exercitarea

Tabela nr. 4

Valorile de fosfagen descompus în mușchiul gastrocnemian de broască curarizat, izolat și supus în condiții de izotonie și fără exercitarea efortului mecanic excitațiilor electrice directe, succesive, comparativ cu valorile obținute de D. Nachmansohn în condiții de izometrie și cu exercitarea efortului mecanic (D.N. Biochem. Z., 196, 80 (1928), tabela IV)

Nr crt.	Nr. excitații	Efort kg	Fosfagen descompus mg H_3PO_4/g mușchi	Felul contracției	Nr. exp. din tabela IV D.N.
1	25	—	0,53	izotonică	—
2	30	12	0,35	izometrică	IV, 2
3	50	—	0,73	izotonică	—
4	63	27	0,88	izometrică	IV, 3
5	100	—	1,12	izotonică	—
6	100	39	0,90	izometrică	IV, 4

efortului mecanic. Pentru aceasta, am determinat descompunerea fosfagenului la un lot de broaște normale sau curarizate, la care un mușchi, *in situ* sau izolat, se contractă sub acțiunea excitațiilor fără exercitarea efortului mecanic, mușchiul simetric fiind în repaus. Pentru comparație, am recurs la valorile de fosfagen descompus sub acțiunea excitațiilor la un alt lot de broaște normale sau curarizate, la care un mușchi încărcat cu o anumită greutate, *in situ* sau izolat, se contractă cu exercitarea efortului mecanic, mușchiul simetric fiind în repaus. Am ales acțiunea unui număr de 25 de excitații, care sînt suficiente pentru a provoca o scindare nu prea mare de fosfagen, precum și acțiunea a 100 de excitații, care provoacă o scindare masivă de fosfagen; greutățile folosite pentru exercitarea efortului mecanic au fost de 20, 50 și 100 g.

Din examinarea tabelei nr. 5 se constată că la mușchiul normal sau curarizat, *in situ* sau izolat, se descompune aproximativ aceeași cantitate de fosfagen fie că mușchiul se contractă sub acțiunea a 25 de excitații fără exercitarea efortului mecanic, fie că el se contractă sub acțiunea a 25 de excitații fiind încărcat cu 20 g sau 100 g. Analiza variantei aplicate la rezultatele acestor determinări arată că între mediile obținute pe aceste loturi nu există diferențe semnificative.

Aceeași constatare se desprinde și în cazul cînd mușchiul se contractă sub acțiunea a 100 de excitații fără exercitarea efortului mecanic, sau cînd el se contractă sub acțiunea a 100 de excitații fiind încărcat cu o greutate de 50, respectiv 100 g. Și în acest caz analiza varianței arată că între mediile obținute pe aceste loturi nu există diferențe semnificative.

Se confirmă deci și prin aceste experiențe cele constatate din analiza rezultatelor experimentale publicate de Nachmansohn [5], și

anume că, în anumite împrejurări, eforturi diferite sînt însoțite de descompunerea aceleraşi cantități de fosfagen şi că descompunerea fosfagenului şi exercitarea efortului mecanic sînt două fenomene independente ; scăderea

Tabela nr. 5

Descompunerea fosfagenului în mușchiul gastrocnemian de broască *(Rana ridibunda)* **normal și curarizat,** *in situ* **și izolat, supus acțiunii excitațiilor electrice directe, succesive, în condiții de izotonie, cu sau fără exercitarea efortului mecanic**
(mg H_3PO_4/g mușchi proaspăt)

Nr. crt.	Nr. excitații	Încărcarea mușchiului (g)	Mușchi *in situ*		Mușchi izolat	
			normal	curarizat	normal	curarizat
1	25	—	0,44	0,70	0,55	0,53
2	25	20	0,63	0,78	0,69	0,66
3	25	100	0,54	0,70	0,65	0,85
$F_{(0,05)} = 3,47$			$F_{exp.} = 1,67$	$F_{exp.} = 0,20$	$F_{exp.} = 0,36$	$F_{exp.} = 2,80$
4	100	—	1,04	1,18	0,87	1,12
5	100	50	1,02	1,41	0,90	1,15
6	100	100	0,86	1,10	0,87	1,35
$F_{(0,05)} = 3,47$			$F_{exp.} = 1,13$	$F_{exp.} = 1,11$	$F_{exp.} = 0,02$	$F_{exp.} = 2,09$

excitabilității prin curarizare nu influențează schimbările nivelului fosfagenului muscular determinate de excitații.

Prezentată la redacție
la 18 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels, I*, Biochem. Z., **196**, 73—97 (1928).
2. D. NACHMANSOHN, *II*, Biochem. Z., **208**, 237—256 (1929).
3. D. NACHMANSOHN, *III*, Biochem. Z., **213**, 262—300 (1929).
4. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate şi excitabilitate musculară*, St. cerc. biochimie, **IV**, *2*, 171—185 (1961).
5. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, *Coeficienții izometrici şi relațiile dintre efort şi fosfagenul muscular*, St. cerc. biochimie, **VI**, *2*, 181—199 (1963).
6. C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, *The colorimetric determination of phosphorus*, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
7. K. LOHMANN, *Über die Isolierung verschiedener natürlichen Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit*, Biochem. Z., **194**, 306 (1928).

8. E. Macovschi, C. Iordache, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului*, St. cerc. biochimie, **V**, *2*, 207—218 (1962).
9. G. Maréchal, W. F. H. M. Mommaerts, *The metabolism of phosphocreatine during an isometric tetanus in the frog sartorius muscle*, Biochim. Biophys. Acta, **70**, 53—67 (1963).
10. G. Maréchal, G. Bleukx, *Le métabolisme de la phosphocréatine durant une contraction isométrique*, Arch. intern. physiol. bioch., **LXXI**, *2*, 280—281 (1963).
11. D. Tănăsescu, *Acizii lactic și piruvic din mușchii gastrocnemiani de broască în contracție izotonică*, St. cerc. biochimie, **VII**, *2*, 285 (1964).
12. Л. Джендрасик, Ж. Фэйст, Факторы, расщепляющие перген в скелетных мышцах. Труды V Междунар. Биох. конгресса, Рефераты секц. сообщ. секции 1—13 Изд. Акад. Наук СССР, Moscova, 1962, 430.
13. F. D. Carlson, A. Siger, *The mecanochemistry of muscular contraction, I, The isometric twich*, J. of Gen. Physiol., *44*, 33—60 (1960).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 205–212, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

CONTRIBUȚII LA STUDIUL TRIPSINOLIZEI PROTEINELOR GLOBULARE DENATURATE PRIN CĂLDURĂ

DE

M. KEREKES

Rezumat. — Autorul a studiat acțiunea tripsinei asupra albuminei serice de bou denaturate prin încălzire în baie de apă. S-a determinat mersul hidrolizei în funcție de temperatura și timpul denaturării. S-a studiat de asemenea și modificarea sensibilității față de tripsină după încetarea încălzirii. S-a stabilit că faza primară a denaturării se instalează aproape instantaneu, după ce temperatura soluției proteice a atins temperatura băii. Prima fază a denaturării este o reacție intramoleculară și prezintă unele analogii cu topirea substanțelor cristaline. Produsul format în cursul fazei primare se caracterizează printr-o stabilitate redusă. Imediat după formarea lui se instalează faza secundară. În cursul acesteia are loc o restructurare a legăturilor eliberate. Din cauza diferențelor existente în conținutul de energie chiar și al aceluiași tip de legături, în cursul denaturării termice se pot forma o serie de compuși intermediari ai proteinei. Acești produși diferă între ei prin sensibilitatea lor față de tripsină. Metoda tripsinolizei poate fi bine utilizată pentru studierea primei faze a denaturării și pentru punerea în evidență a formelor intermediare, apărute în cursul denaturării.

Proteinele denaturate sînt mult mai ușor accesibile acțiunii fermenților proteolitici decît cele native. Mult timp s-a crezut că orice proteină, pentru a putea fi atacată de proteinaze, trebuie mai întîi denaturată [1—4]. Înseși proteinazelor li s-a atribuit o acțiune „denaturazică" [5], [6], dar această ipoteză s-a dovedit lipsită de temei [7]. În prezent se consideră că, datorită structurii lor, proteinele globulare sînt rezistente la acțiunea proteinazelor. Numărul legăturilor scindabile aflate la suprafața moleculei este foarte redus, căci majoritatea lor se află în stare „mascată" în interiorul ei, fiind astfel inaccesibile enzimei. Cu cît enzima este mai specifică și substratul ei are o structură mai compactă, cu atît probabilitatea scindării este mai redusă [8]. În cursul denaturării, legăturile scindabile devin în parte sau în întregime accesibile enzimei, ca urmare a deplierii lanțurilor polipeptidice.

În cursul cercetărilor de acest gen, s-au întrebuințat în general agenți denaturanți drastici : încălzirea soluțiilor proteice la 100°C, acțiunea acizilor și bazelor puternice sau a ureei concentrate [9], [10]. Desigur că aceste procedee nu pot da lămuriri decît asupra stării finale a denaturării. Cercetările descrise mai jos au ca scop stabilirea unei corelații mai precise între modificările structurale ale proteinelor globulare, produse sub acțiunea denaturării prin căldură, și modificarea sensibilității produșilor față de acțiunea tripsinei.

METODA DE LUCRU

Am întrebuințat ca substrat albumină serică de bou cristalizată (SERVA), în soluție de 1% și tripsină (MERCK) avînd aceeași concentrație. Soluțiile au fost preparate cu tampon fosfatic M/15, cu pH 7,8.

Denaturarea s-a efectuat încălzind în baie de apă cîte 1 ml din soluția de albumină, aflată în eprubete mici, de aceleași dimensiuni. Temperatura denaturării și timpul sînt indicate mai jos. După încălzire, soluțiile au fost răcite 30 s la 20°C, li s-a adăugat 1 ml soluție de tripsină și s-au incubat imediat la 40°C, timp de 10 min. După incubare, proteina nehidrolizată s-a precipitat prin adăugire de 2 ml acid tricloracetic 6% (concentrația finală 3%), filtrînd peste 10 min. Concentrația produșilor hidrolizei s-a determinat cu reactiv Folin-Ciocîlteu, extincția citindu-se față de apă distilată, la fotometrul Pulfrich cu filtru S 61. Ca martor s-a utilizat soluție albuminică nativă, tratată în mod asemănător celei denaturate. Gradul hidrolizei s-a exprimat cu ajutorul extincțiilor citite, scăzînd valoarea martorului din aceea a probelor. Cu ajutorul metodei descrise am studiat :

— influența duratei de încălzire asupra sensibilității față de tripsină a albuminei serice denaturate și

— evoluția tripsinorezistenței albuminei denaturate după încetarea încălzirii, în diferite condiții.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Într-o experiență preliminară, cu caracter orientativ, am studiat efectul duratei de încălzire asupra tripsinorezistenței albuminei încălzite la 70°C (tabela nr. 1). Din tabelă reiese că, după o încălzire de 5 min, sensibilitatea maximă este deja atinsă, și scade din nou paralel cu prelungirea timpului. Reducînd și mai mult durata de încălzire, am obținut datele reprezentate grafic în figura 1. Se observă că valorile maxime ale hidrolizei sînt atinse chiar după o încălzire de 1 min. Prelungind durata încălzirii, aceste valori marchează o ușoară scădere la temperaturile de

50, 60, 70 și 80° C, rămîn practic neschimbate la 90° C și manifestă o ușoară creștere la 100°C.

Tabela nr. 1

Variația tripsinorezistenței albuminei serice de bou, încălzită în soluție de tampon fosfatic cu pH 7,8, la temperatura de 70° C

Timpul încălzirii (min)	Intensitatea tripsinolizei (extincție)
5	0,118
10	0,107
20	0,106
30	0,104
60	0,099

Reprezentînd grafic valorile hidrolizei înregistrate după o denaturare de 1 min, se obține curba *a* din figura 2, care arată creșterea bruscă a sensibilității față de tripsină în intervalele de temperatură de 60—70° și 90—100°C.

Lăsînd albumina denaturată un minut în repaus timp de 24 de ore la 20°C, se constată creșterea rezistenței față de tripsină (curba *b* din fig. 2). Comportarea proteinei după denaturare depinde de temperatura la care este lăsată să stea în repaus (tabela nr. 2).

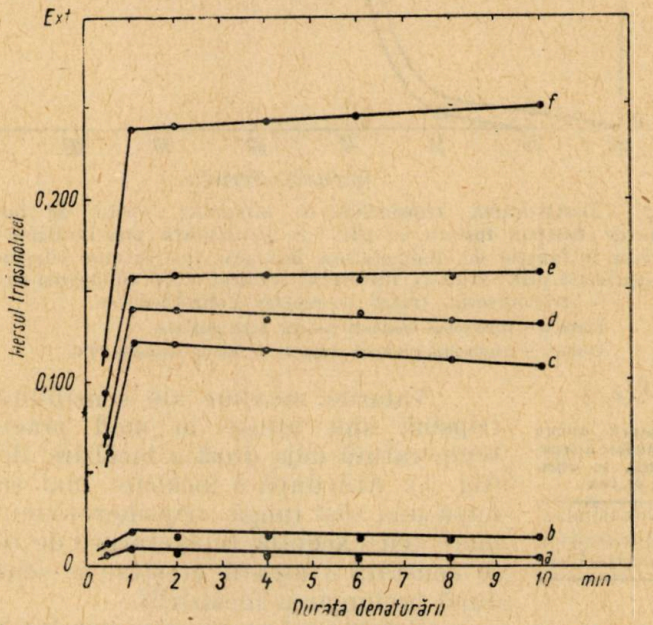


Fig. 1. — Desfășurarea tripsinolizei la albumina serică de bou în soluție de tampon fosfatic cu pH 7,8, denaturată prin încălzire, în funcție de timpul expunerii. Intensitatea tripsinolizei este exprimată prin extincția filtratului rezultat după adăugarea de acid tricloracetic, tratat cu reactiv Folin-Ciocîlteu.

Curba *a* — denaturare la 50°C.
Curba *b* — denaturare la 60°C.
Curba *c* — denaturare la 70°C.
Curba *d* — denaturare la 80°C.
Curba *e* — denaturare la 90°C.
Curba *f* — denaturare la 100°C.

Proteina denaturată, lăsată în repaus timp de 24 de ore și încălzită din nou, nu-și mai modifică sensibilitatea (tabela nr. 3).

Interpretarea acestor rezultate ne permite să tragem unele concluzii privind mai ales desfășurarea celor două faze ale denaturării.

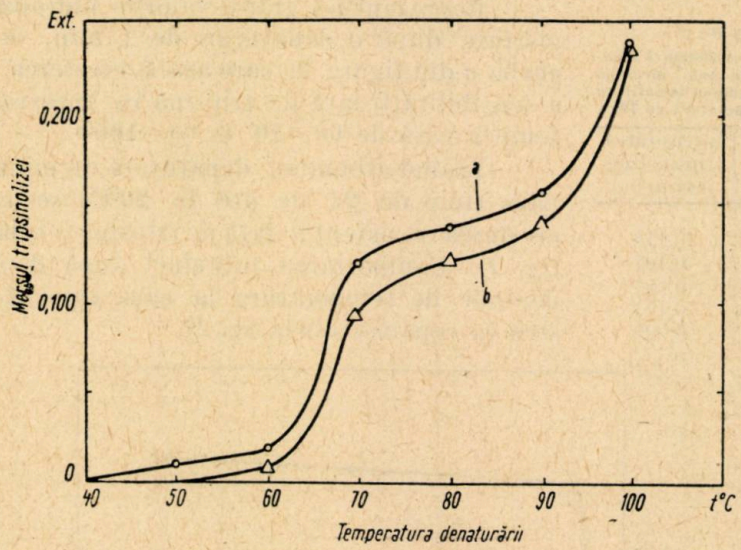


Fig. 2. — Desfășurarea tripsinolizei la albumina serică de bou în soluție de tampon fosfatic cu pH 7,8, denaturată prin încălzire timp de 1 min, în funcție de temperatura încălzirii. Intensitatea tripsinolizei este exprimată prin extincția filtratului rezultat după adăugarea de acid tricloracetic, tratat cu reactiv Folin-Ciocîlteu.

Curba *a* — tripsinoliză efectuată imediat după încălzire.

Curba *b* — tripsinoliză efectuată după 24 de ore de repaus la 20°C.

Tabela nr. 2

Influența temperaturii asupra evoluției fazei secundare a denaturării prin căldură, la albumina serică de bou

Felul tratării soluției proteice	Intensitatea tripsinolizei (extincție)
Încălzire la 70°C timp de 1 min, urmată de tripsinoliză	0,121
Tripsinoliză după 24 de ore de repaus la +20°C	0,096
Tripsinoliză după 24 de ore de repaus la +2°C	0,118

Valorile maxime ale sensibilității față de tripsină sînt atinse în mod practic la orice temperatură deja după o încălzire de un minut (fig. 1). Atît după o încălzire mai scurtă, cît și după una mai lungă, tripsinorezistența este mai mare (cu excepția temperaturii de 100°C, la care se constată o ușoară creștere a sensibilității și după prelungirea încălzirii).

Fenomenul poate avea următoarea explicație: sensibilitatea maximă față de tripsinoliză survine imediat după terminarea primei faze a denaturării. Aici are loc deplierea catenelor polipeptidice, acestea prezentînd cea mai mare suprafață și, în consecință, și cel mai mare număr de legături peptidice accesibile enzimei. În continuare se instalează faza secundară, care constă din restructurarea grupărilor reactive eliberate, ceea ce duce la o nouă complicare a structurii, mai ales prin formarea agregatelor intermoleculare. Prin urmare, tripsinorezistența crește din nou. Valorile

reduse ale hidrolizei, obținute după o denaturare de 30 s, se datoresc faptului că soluția proteică nu preia în întregime temperatura băii în acest scurt interval de timp.

Creșterea bruscă a sensibilității față de tripsinoliză după o încălzire de 1 min, cînd soluția proteică atinge temperatura băii, constituie o dovadă în favoarea ipotezei potrivit căreia prima fază a denaturării prezintă o oarecare analogie cu punctul de topire al substanțelor cristaline, supoziție preconizată încă de F. Haurowitz [11]. Pe baza rezultatelor obținute, trebuie să relevăm însă că substanțele proteice cu o structură mai complexă — cum este și albumina serică — au nu un singur „punct de topire", ci mai multe, în funcție de temperatura denaturării. Încălzind proteina la o anumită temperatură, legăturile a căror energie nu rezistă acestei temperaturi se desfac aproape instantaneu. O diferență esențială față de topirea substanțelor cristaline o constituie însă și faptul că „topirea" proteinei are loc în soluție apoasă, ceea ce înseamnă că nu poate fi neglijată acțiunea moleculelor de apă, care contribuie și ele la slăbirea sau la desfacerea unor legături (ca, de exemplu, cele de hidrogen).

Tabela nr. 3

Influența încălzirii efectuate după terminarea fazei secundare a denaturării asupra tripsinorezistenței albuminei serice de bou

Felul tratării soluției proteice	Intensitatea tripsinolizei (extincție)
Încălzire la 100°C timp de 10 min, urmată imediat de tripsinoliză	0,248
Tripsinoliză efectuată după 24 de ore de repaus la +20°C	0,203
Încălzirea soluției precedente din nou la 100°C, timp de 10 min	0,205

Rezultatele noastre dovedesc totodată că în cursul denaturării apar mai multe etape intermediare, așa cum au presupus și alți cercetători [11], [12], fără însă ca aceste etape să fie bine definite. Modificările intermediare survenite în cursul denaturării se deosebesc între ele prin numărul legăturilor desfăcute, care mențin structura terțiară și secundară. Aceste legături pot fi încadrate în mai multe tipuri: interacțiuni slabe între grupările polare ionizate și neionizate, atracții de tip van der Waals, interacțiuni între catenele laterale alifatice și, în sfîrșit, legături de hidrogen. Chiar și legăturile disulfurice — care, de altfel, nu se desfac printr-o simplă încălzire — pot eventual participa la acest proces, printr-un schimb disulfuric. Faptul că există mai multe etape intermediare decît tipuri de legături se datorește împrejurării că nu toate legăturile care aparțin aceleiași categorii sînt la fel de puternice, conținutul lor în energie variind în funcție de lungimea catenelor laterale, de natura grupărilor vecine etc.

Reprezentînd grafic valorile hidrolizei obținute după o încălzire de 1 min, în funcție de temperatură, se obține curba *a* din figura 2. Evoluția curbei reflectă desfacerea structurii terțiare și secundare a albuminei în cursul denaturării.

Între 50 și 60°C sînt desfăcute cele mai slabe legături, care contribuie la menținerea structurii terțiare. În continuare, curba prezintă două creșteri bruște, în intervalele de 60—70° și 90—100°C. Aceste intervale corespund, desigur, desfacerii unor anumite categorii de legături.

Este posibil ca aceste două tipuri să fie interacțiunile alifatice și legăturile de hidrogen, care ambele predomină, de fapt, în molecula proteinelor globulare. Porțiunea plată dintre 70 și 90°C corespunde unei faze intermediare desfacerii legăturilor acestor două tipuri, cînd din fiecare tip se desfac, probabil, numai cîteva.

Rezultate asemănătoare am obținut și în cazul tripsinolizei proteinelor serice umane denaturate [13].

După instalarea primei faze a denaturării are loc imediat trecerea la faza secundară. Încălzirea în continuare a soluției proteice accelerează evoluția acestei faze, care se produce însă și la temperaturi mai joase : faza primară „declanșează" faza secundară [13]. Astfel, după încetarea încălzirii se observă modificarea parametrilor soluției proteice (vîscozitatea, densitatea optică etc.) timp de mai multe ore, pînă cînd, în sfîrșit, se nstalează o stare finală stabilă. Tripsinorezistența se modifică și ea. Curba *b* din figura 2 reprezintă valorile tripsinolizei după un repaus de 24 de ore al soluției proteice încălzite timp de 1 min la temperaturile indicate în grafic.

În cursul repausului după denaturările efectuate la 50 și 60°C, se pare că are loc o renaturare adevărată. Peste 60°C însă, creșterea tripsinorezistenței în cursul repausului nu mai poate fi considerată ca o renaturare. De fapt, are loc o progresiune a procesului de denaturare, care cauzează modificări structurale de așa natură, încît provoacă o nouă creștere a rezistenței față de tripsină. Aceste modificări pot fi puse în evidență cu ajutorul unor metode subtile, ca, de exemplu, cele imunologice.

Temperatura la care soluția proteică este menținută în cursul fazei secundare are o influență hotărîtoare asupra evoluției acestei faze (tabela nr. 2).

O nouă denaturare, efectuată după terminarea fazei secundare, nu mai modifică tripsinorezistența (tabela nr. 3). În cursul fazei secundare au loc regrupări ale legăturilor de așa natură, încît o nouă încălzire nu le mai modifică sensibilitatea față de tripsină.

CONCLUZII

Rezultatele noastre ne îndreptățesc să afirmăm că faza primară a denaturării la proteinele globulare are loc aproape instantaneu, fiind o reacție intramoleculară prin excelență. Desfacerea succesivă a diferitelor tipuri de legături se manifestă prin existența mai multor forme denaturate, care se deosebesc între ele prin numărul legăturilor desfăcute. Metoda tripsinolizei este foarte potrivită pentru studierea primei faze a denaturării și pentru punerea în evidență a modificărilor apărute.

Faza secundară, care cuprinde atît reacții intra- cît și intermoleculare, decurge foarte lent, mai ales la temperaturi joase. Formele finale ale proteinei denaturate, produse după încetarea reacțiilor din faza secundară, pot fi și ele variate, în funcție de etapa la care s-a ajuns în prima fază a denaturării.

Prezentată la redacție
la 14 octombrie 1963

Laboratorul de biochimie,
Baza de cercetări științifice Tîrgu-Mureș
a Academiei R.P.R.

BIBLIOGRAFIE

1. K. Lin, H. Wu, T. Chen, Chin. J. Physiol., **11**, 107 (1928).
2. M. L. Anson, A. E. Mirsky, J. Gen. Physiol., **17**, 339 (1934).
3. К. И. Страчицкий, М. П. Черников, Биохимия, *12*, 277 (1947).
4. S. S. Rao, Indian J. Med. Res., **43**, 612 (1955).
5. А. В. Благовещенский, Усп. биол. хим., *12*, 3 (1936).
6. L. K. Christensen, C. R. trav. lab. Carlsberg., Sér. Chim., **28**, 37 (1952).
7. М. П. Черников, Биохимия, *23*, 325 (1958).
8. P. D. Boyer, H. Lardy, K. Myrback, *The enzymes*, ed. a 2-a, New York-Londra, Academic Press, 1960, vol. IV, p. 93—97.
9. L. Gorini, A. I. Audrain, Biochim. Biophys. Acta, *19*, 289 (1956).
10. К. И. Страчицкий, К. Ф. Фирфарова, А. Е. Гурвич, Биохимия, *18*, 305 (1953).
11. F. Haurowitz, *Eiweissdenaturierung*, în *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, ed. a 10-a, Berlin—Göttingen—Heidelberg, Springer, 1960, vol. IV/1, p. 125.
12. E. Ühlein, Materia Medica Nordmark, *5—6*, 219 (1956).
13. M. F. Kerekes, Naturwiss., *17*, 573 (1963).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 213–220, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

RELAȚII DE ANTIGENITATE ÎNTRE PROTEINELE SERICE MATERNE, IMUNOGLOBULINELE COLOSTRALE ȘI PROTEINELE SERICE ALE NOU-NĂSCUTULUI LA BOVINE

DE

V. V. MICUȘAN și LUCIA BUZILĂ

Rezumat. — Cu ajutorul tehnicilor de imunodifuzie s-au studiat relațiile de antigenitate între γ-globulinele serice de vacă și imunoglobulinele laptelui colostral. S-a constatat că la vițelul nou-născut imaginea imunoelectroforetică a serului sanguin arată absența liniei de precipitare caracteristică γ-globulinelor și a unei fracțiuni din zona β-globulinelor. După ingestia de colostru, linia γ-globulinelor apare la un interval foarte scurt, fracțiunea din zona β-globulinelor continuînd să fie absentă.

În urma rezultatelor obținute se presupune existența relațiilor de antigenitate între γ-globulinele serice de vacă, imunoglobulinele colostrale și γ-globulinele proaspăt apărute în sîngele vițelului după ingestia de colostru.

Se menționează faptul că metoda izolării imunoglobulinelor colostrale cu rivanol nu satisface din punctul de vedere al purității materialului obținut.

Legătura dintre proteinele serice și cele din laptele colostral a fost studiată la animale de diferiți autori [1—4]. În urma acestor lucrări s-a ajuns la concluzia că albuminele, imunoglobulinele și γ-cazeina ajung în lapte din fluxul sanguin. Aplicarea tehnicilor de imunoprecipitare în studiul corespondenței antigenice a sîngelui cu laptele a confirmat acest fapt atît la om [5], cît și la bovine [6], [7].

Trecerea — în special a imunoglobulinelor — din sîngele matern în laptele colostral are o însemnătate deosebită la rumegătoare. La aceste animale, transferul imunoglobulinelor se face numai prin laptele colostral, deoarece placenta de tip sindesmocorial formează o barieră pentru anticorpi [8], [9]. Din această cauză, animalele nou-născute sînt lipsite sau au numai urme de γ-globuline [4], [9], [10]. Imunizarea nou-născutului se face numai prin ingestia de lapte colostral, foarte bogat în aceste proteine. Această categorie de proteine apare în sîngele animalului nou-născut la 1—2 ore după ingestia de colostru. Permeabilitatea intestinală durează în general 24 de ore după naștere [11], [12].

Mecanismul apariției imunoglobulinelor în sîngele animalelor nounăscute a constituit obiectul mai multor cercetări [13], [14], [15], fără ca pînă acum el să fie bine lămurit. Comline și colaboratori [13], Belafour și Comline [14] au arătat că imunoglobulinele colostrale sînt absorbite de către intestinul subțire și purtate de limfă spre sîngele periferic și că numai o mică cantitate ajunge în sistemul vascular portal. Trecerea imunoglobulinelor prin peretele intestinului subțire se face prin celulele colonale epiteliale ale acestuia. Această trecere făcîndu-se într-un ritm foarte rapid, imunoglobulinele au fost identificate electroforetic, imunologic și prin ultracentrifugare în serul sanguin al animalelor nou-născute la numai cîteva ore după ingestia de colostru [12], [16], [17], [18], [19]. Viteza mare de absorbție a imunoglobulinelor duce la ipoteza că acestea ajung în circuitul sanguin al animalelor nou-născute fără modificări importante de structură și cu păstrarea proprietăților lor antigenice [20].

Plecînd de la aceste considerații, ne-am propus să cercetăm existența relațiilor de antigenitate între serul sanguin de vacă și imunoglobulinele izolate din laptele colostral. În continuare, am urmărit relațiile de antigenitate dintre serul sanguin de viței nou-născuți, înainte și după ingerarea de colostru, și serul sanguin de vacă, pe de o parte, și între serul acelorași viței și imunoglobulinele colostrale, pe de altă parte.

Metoda folosită pentru urmărirea trecerii γ-globulinelor sanguine de vacă în colostru și, de aici, în sîngele vițelului nou-născut, a fost aceea de imunoprecipitare în gel de agar.

MATERIAL ȘI METODE

Proteinele serice s-au obținut prin recoltarea sîngelui din vena jugulară, de la vaci și viței de rasă brună. După îndepărtarea cheagului sanguin, serul a fost centrifugat la 3 000 de ture/min, timp de 10 minute. Păstrarea serului centrifugat s-a făcut în frigider, la 4°C, și cu un adaos de mertiolat de sodiu 1/5 000.

Proteinele din zerul de colostru s-au preparat din lapte colostral proaspăt, prin precipitarea cazeinei la punctul izoelectric, cu acid acetic 10%. Cazeina precipitată se înlătură prin centrifugare, la 5 000 de ture/min timp de 15 minute. Zerul de colostru astfel obținut s-a dializat față de apă distilată, în frigider. Schimbarea apei se face din 12 în 12 ore, iar dializa continuă pînă la îndepărtarea completă a acidului acetic. Imunoglobulinele din acest zer de colostru se obțin prin fracționare cu rivanol 0,4%, după tehnica descrisă de Kenyon și colaboratori [21]. După îndepărtarea rivanolului cu cărbune activ și eliminarea acestuia prin centrifugare, urmată de filtrare, se obține un supernatant clar, care conține imunoglobuline. Acest supernatant a fost apoi concentrat în vid, pe P_2O_5, și în final liofilizat.

Serurile imune s-au obținut prin hiperimunizarea unor iepuri în vîrstă de 8 luni cu ser sanguin de vacă și imunoglobuline colostrale. Hiperimunizarea s-a realizat prin administrarea unei doze de 400 mg proteină, în 5 injecții subcutane, în ritm de o inoculare pe săptămînă, folosind ca adjuvant hidroxidul de aluminiu. La sfîrșitul perioadei de imunizare, animalele au avut următoarele titruri medii: antiserul față de serul sanguin de vacă 1 : 10 000, iar față de imunoglobuline (soluție 2%) 1 : 5 000. Serurile recoltate steril au fost fiolate și păstrate la frigider pînă în momentul utilizării.

Analiza electroforetică pe hîrtie s-a făcut cu un aparat de tip Juan, folosind un tampon veronal sodic-acetat de sodiu de pH 8,6 și forță ionică $\mu = 0,1$. Tensiunea folosită, 5 V/cm, intensitatea, 0,5 mA/cm. Migrările s-au făcut pe hîrtie Schleicher-Schüll 2 043 b Mgl, timp de 10 ore. Colorarea s-a făcut cu albastru de brom-fenol, prin metodele obișnuite [22].

Dubla difuzie în agar s-a efectuat după metoda Ouchterlony [23].

Analizele imunoelectroforetice s-au executat după metoda Scheidegger [24], în tampon veronal-veronal sodic de pH 8,6, forța ionică a tamponului în cuvă fiind de $\mu = 0,05$, iar în plăci de $\mu = 0,017$. Potențialul, 20 V/cm, intensitatea, 1 mA/cm, durata migrării, 2 ore. Imunodifuzia s-a făcut în camere umede, la temperatura laboratorului, plăcile fiind apoi prelucrate după metodele curente [25].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Față de laptele normal, colostrul prezintă unele deosebiri, atît din punct de vedere cantitativ cît și calitativ [8], [10]. Analiza imunoelectroforetică a laptelui colostral, față de un antiser specific laptelui normal, arată că liniile de precipitare corespunzătoare imunoglobulinelor sînt mai bine marcate, albuminele fiind mai slab reprezentate [26].

Căutînd să stabilim relații de antigenitate între proteinele serului sanguin de vacă și imunoglobulinele colostrale, am studiat reacția de identificare prin dublă difuzie în gel de agar, folosind sistemul ser antiproteine de vacă, ser antiimunoglobulinic și imunoglobuline colostrale izolate (fig. 1, schema *a*). Faptul că linia de precipitare cantitativ mai bine reprezentată, corespunzătoare, probabil, anticorpilor față de γ-globuline s-a unit, pledează pentru o identitate antigenică între aceste fracțiuni. Confirmarea am obținut-o cu ajutorul imunoelectroforezei.

În figura 2 este reprezentată varianta imunoelectroforetică a reacției de dublă difuzie, corespunzătoare schemei *a* din figura 1. Se constată în acest caz că anticorpii formați față de imunoglobulinele izolate din colostru și cei formați față de γ-globulinele serice de vacă sînt identici, liniile de precipitare unindu-se.

Prezența unor linii de precipitare în zona α-globulinelor și a albuminelor, la întîlnirea imunoglobulinelor cu serul antiimunoglobulinic, se datorește anticorpilor produși și față de alte proteine, ca β- și α-globuline, β-lactoglobulină și α-lactalbumină, care impurifică imunoglobulinele izolate din zerul de colostru.

Dacă se analizează față de aceleași antiseruri serul sanguin de vacă (fig. 3), se constată și în acest caz că anticorpii formați față de imunoglobulinele izolate din colostru și cei corespunzători γ-globulinelor din serul de vacă sînt identici. Unirea liniilor de precipitare spre capătul catodic confirmă acest fapt. Se observă de asemenea că linia caracteristică γ-globulinelor prezintă o ușoară inflexiune și o dedublare în apropierea extremității catodice. Această dedublare este prezentă atît la întîlnirea serului antiimunoglobulinic cu serul de vacă, cît și la întîlnirea acestuia cu antiserul său. Această dedublare a liniei de precipitare corespunză-

toare γ-globulinelor a fost descrisă și de Hanson [27] în unele cazuri, la analiza laptelui colostral de om cu serul anticolostru omolog. Deoarece nu am putut identifica aceste linii de precipitare cu o linie cunoscută, am notat cu γ′ linia de precipitare principală, corespunzătoare γ-globulinelor, și cu γ″ linia secundară, care se desprinde din linia principală. Imaginea imunoelectroforetică din figura 3 mai arată de asemenea că imunoglobulinele izolate din zerul de colostru nu sînt suficient de pure.

Rezultatele obținute din analiza imunoelectroforegramelor reprezentate în figurile 2 și 3, prin care se confirmă că imunoglobulinele din colostru și γ-globulinele serice sînt înrudite serologic, sînt asemănătoare cu cele obținute de Hanson și Johansson [6], [7] la analiza laptelui normal de vacă. Acești autori au arătat că cel puțin 6 linii de precipitare, din cele 12 obținute la analiza imunoelectroforetică a laptelui normal cu antiserul său specific, prezintă o înrudire serologică cu proteinele din sînge.

Imaginile imunoelectroforetice prezentate în figurile 2 și 3 au arătat prezența unor impurități care apar în imunoglobulinele colostrale la fracționarea zerului de colostru cu rivanol. Această metodă nu permite obținerea imunoglobulinelor în stare de puritate imunologică, deși o analiză mai superficială, bazată pe electroforeza pe hîrtie, nu arată acest fapt. În figura 4 prezentăm, comparativ, electroforeza zerului de colostru liofilizat [1], a imunoglobulinelor izolate cu rivanol și liofilizate [2] și aceea a zerului de colostru proaspăt, neliofilizat [3]. Conform acestei analize, nu se observă nici o impurificare a imunoglobulinelor, soluțiile supuse electroforezei conținînd în toate cele trei cazuri o concentrație de 5 g% proteine. Analizînd însă imunoglobulinele liofilizate pe gel de agar, se observă impurificarea acestora cu mici cantități de β-lactoglobulină, α-lactalbumină, alături de alte proteine specifice serului (fig. 5), fapt demonstrat de analiza imunoelectroforetică (fig. 2 și 3).

Relațiile de antigenitate care există între globulinele serice și imunoglobulinele colostrale ne-au determinat să cercetăm, cu ajutorul metodelor imunoelectroforetice, apariția γ-globulinelor în sîngele vițeilor nounăscuți. Vițeii își însușesc prin supt imunoglobulinele din colostru, care apar apoi în sînge, la scurt interval, și ocupă în diagrama electroforetică locul γ-globulinelor (fig. 6).

Reacțiile de dublă difuzie în gel de agar (schema *b*, fig. 1) arată apariția mai multor linii de precipitare între serul antivacă și serul de viței nou-născut, corespunzătoare albuminei, α- și β-globulinelor. Față de serul antiimunoglobulinic, serul de viței nou-născut nu prezintă decît o singură linie slabă, care se unește cu una dintre liniile existente față de serul antivacă și care se datorește impurităților din imunoglobulinele izolate din zerul de colostru. În schema *c* (fig. 1) este reprezentat rezultatul dublei difuzii în agar a acelorași antiseruri, însă față de ser sanguin de viței recoltat la 24 de ore după ingestia de colostru. Apariția în sîngele vițelului a imunoglobulinelor conduce la o imagine asemănătoare cu aceea din schema *a* (fig. 1), arătînd că antigenitatea acestora se păstrează.

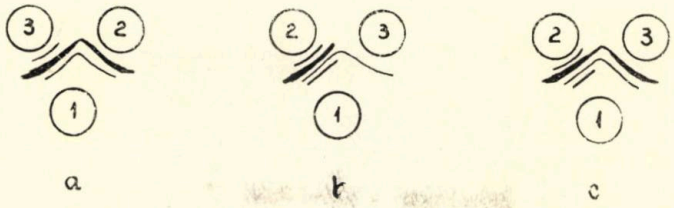


Fig. 1. — Reacţii de dublă difuzie comparată între :
a) imunoglobuline (1), ser antiimunoglobulinic (3) şi ser antivacă (2).
b) ser de viţel nou-născut (1), ser antivacă (2) şi ser antiimunoglobulinic (3).
c) ser de viţel la 24 de ore după ingestia de colostru (1), ser antivacă (2) şi ser antiimunoglobulinic (3).

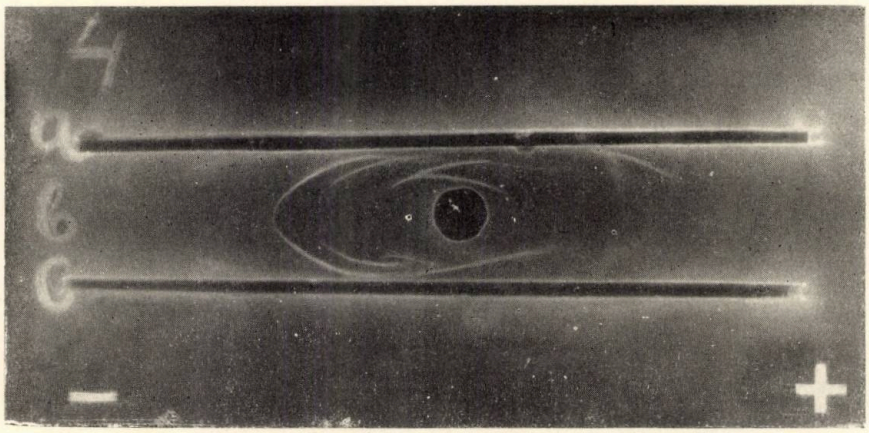


Fig. 2. — Imunoelectroforegrama : imunoglobuline (*b*) faţă de ser antiimunoglobulinic (*a*) şi ser antivacă (*c*).

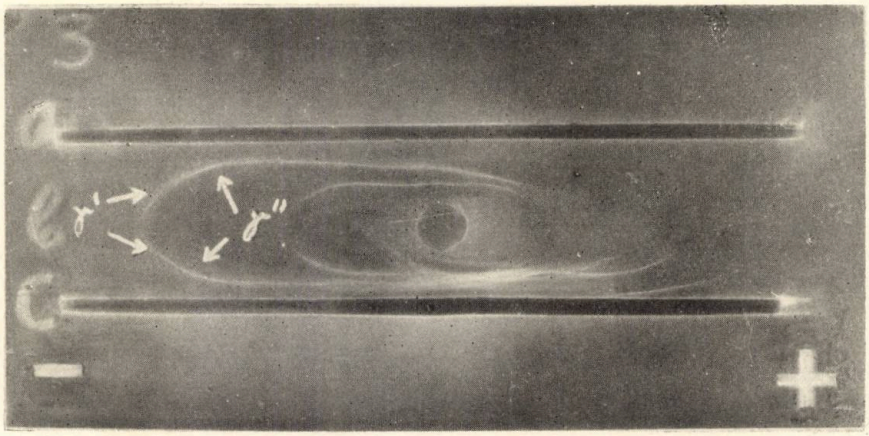


Fig. 3. — Imunoelectroforegrama : ser de vacă (*b*) faţă de ser antiimunoglobulinic (*a*) şi ser antivacă (*c*).

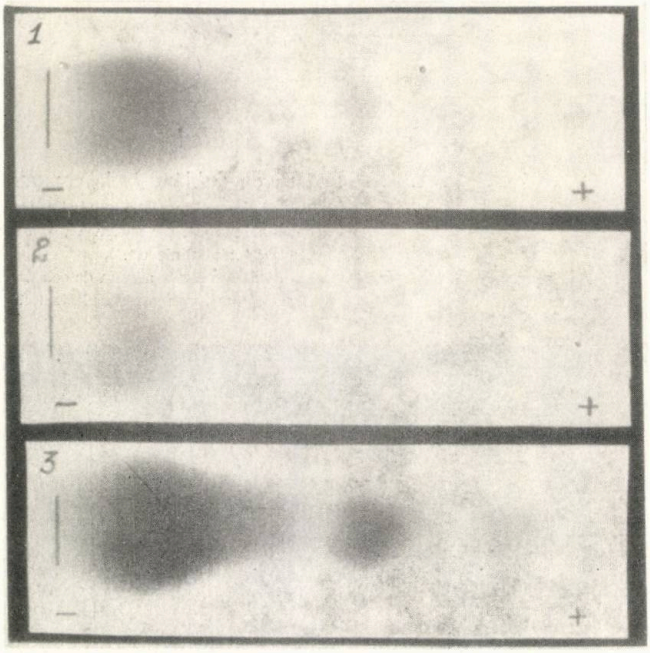


Fig. 4. — Electroforegrama pe hîrtie a zerului de colostru total liofilizat (1), a imunoglobulinelor colostrale izolate cu rivanol şi liofilizate (2) şi a zerului de colostru proaspăt.

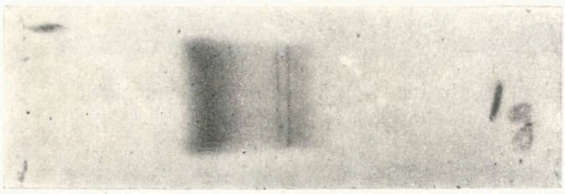


Fig. 5. — Electroforegrama în gel de agar a imunoglobulinelor colostrale izolate cu rivanol.

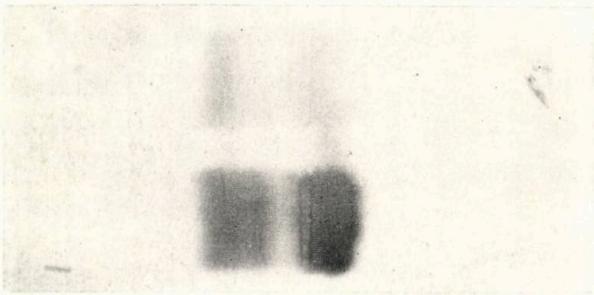


Fig. 6. — Compararea mobilităţii electroforetice a imunoglobulinelor colostrale izolate şi a γ-globulinelor apărute în sîngele de viţel nou-născut după ingestia de colostru.

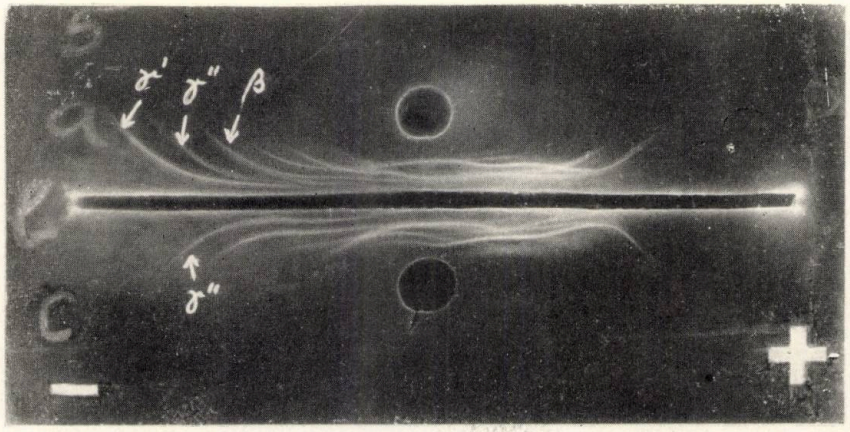


Fig. 7. — Imunoelectroforegrama : ser antivacă (*b*) față de ser de vacă (*a*) și ser de viței nou-născut înainte de ingerarea colostrului (*c*).

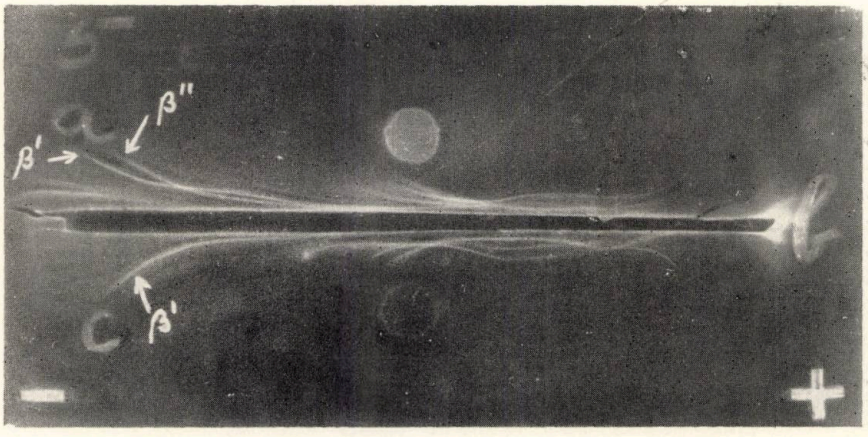


Fig. 8. — Imunoelectroforegrama : ser antivacă (*b*) față de ser de vacă (*a*) și ser de viței nou-născut înainte de ingerarea colostrului (*c*), migrare mai lungă pentru întinderea zonei β-globulinelor.

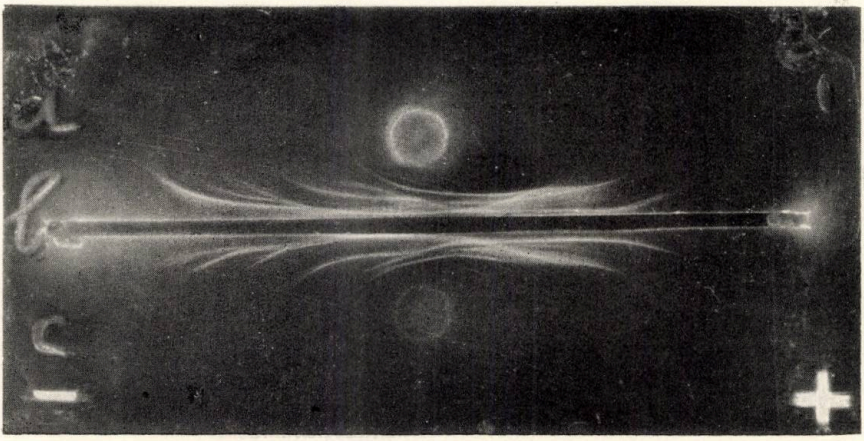


Fig. 9. — Imunoelectroforegrama : ser antivacă (*b*) față de ser de vacă (*a*) și ser de viței după ingerarea colostrului (*c*).

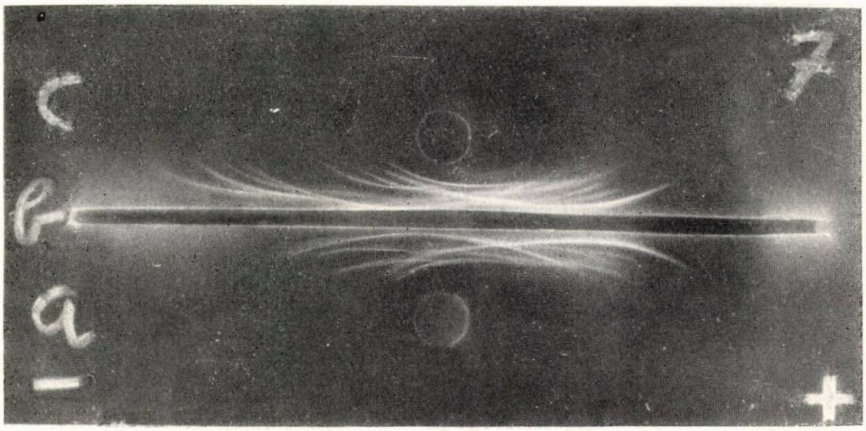


Fig. 10. — Imunoelectroforegrama : ser antivacă (*b*) față de ser de viței nou-născut înainte de ingerarea colostrului (*a*) și după ingerarea colostrului (*c*).

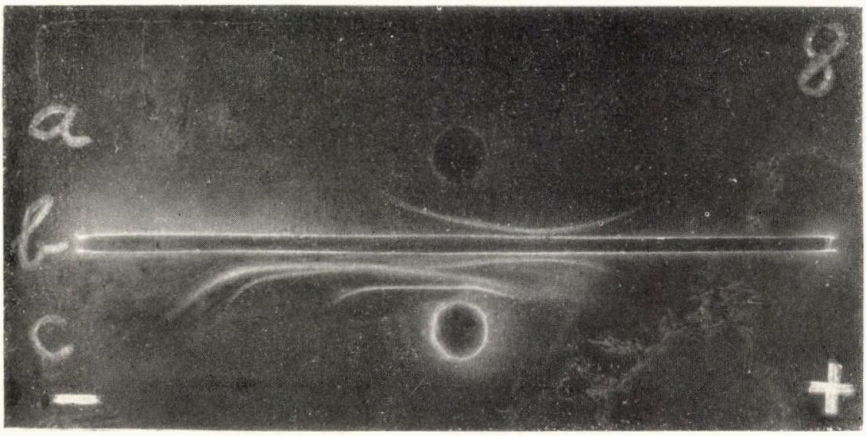


Fig. 11. — Imunoelectroforegrama : ser antiimunoglobulinic (*b*) față de ser de viței nou-născut înainte de ingerarea colostrului (*a*) și serul de vacă (*c*).

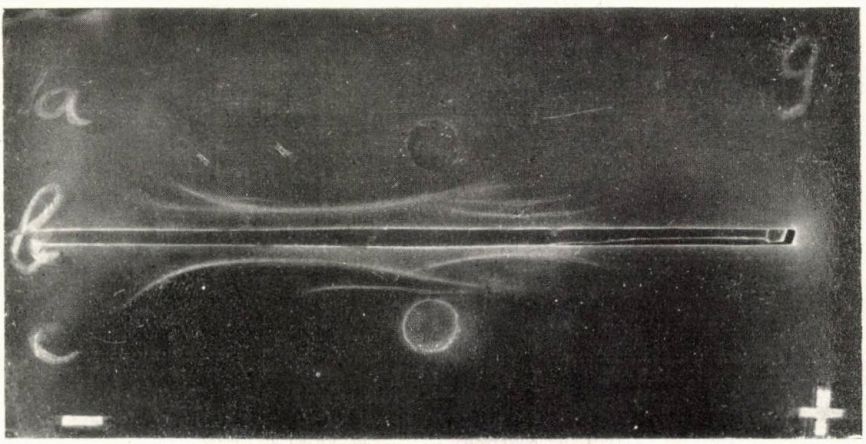


Fig. 12. — Imunoelectroforegrama : ser antiimunoglobulinic (*b*) față de ser de viței după ingerarea colostrului (*a*) și serul de vacă (*c*).

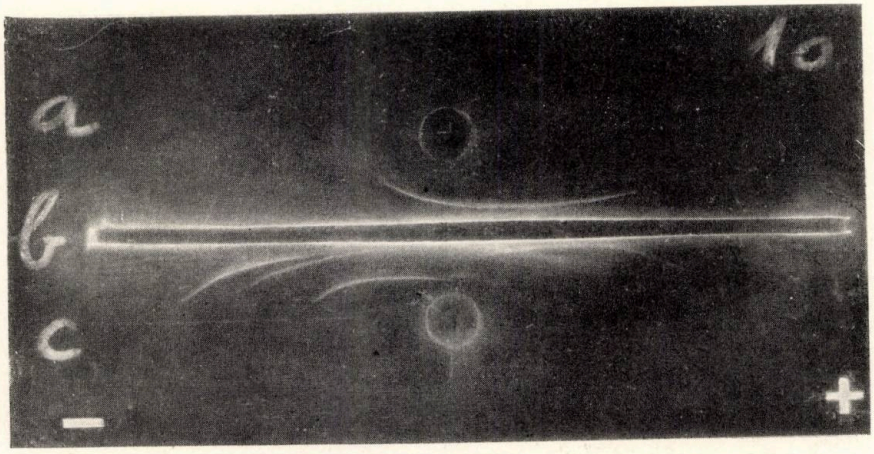


Fig. 13. — Imunoelectroforegrama : ser antiimunoglobulinic (*b*) față de ser de vițel nou-născut înainte de ingerarea colostrului (*a*) și după ingerarea colostrului (*c*).

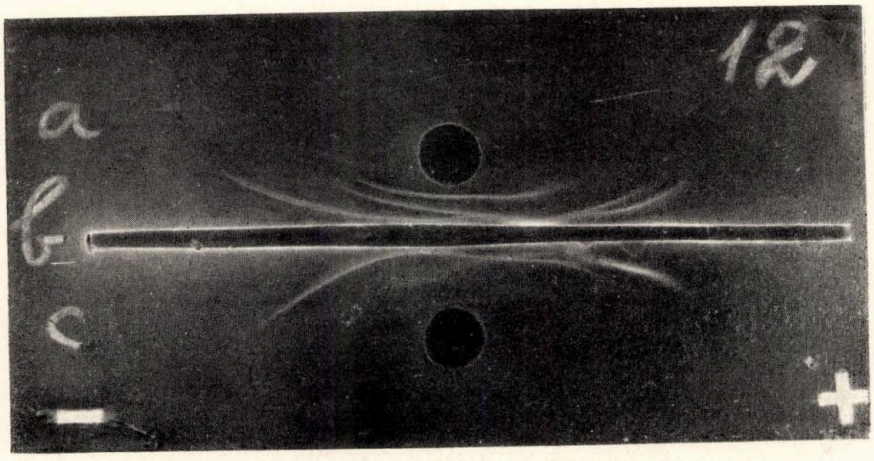


Fig. 14. — Imunoelectroforegrama : ser antiimunoglobulinic (*b*) față de ser de vițel după ingerarea colostrului (*a*) și imunoglobuline colostrale izolate cu rivanol (*c*).

Imunoelectroforegrama din figura 7 arată că la vițelul nou-născut, folosind antiserurile preparate de noi, nu am putut identifica prezența liniilor de precipitare corespunzătoare γ'-globulinelor, identificîndu-se în unele cazuri numai linia γ''. Am încercat să lărgim zona globulinelor printr-o migrare electroforetică mai lungă, iar din analiza liniilor de precipitare rezultă că la vițelul nou-născut lipsește, în raport cu serul de vacă, încă o linie de precipitare din zona β-globulinelor, pe care am notat-o cu β''. Restul liniilor de precipitare sînt identice (fig. 8).

Analizînd în continuare serul sanguin de viței la 1—1 $^1/_2$ ore după ingestia de colostru (fig. 9), se constată prezența liniei de precipitare γ', la început mai slab, apoi întărindu-se, o dată cu ingerarea unor cantități mai mari de colostru. În zona β-globulinelor am constatat și în acest caz lipsa liniei de precipitare β''.

Comparînd în imunoelectroforegrama din figura 10 serul sanguin de vițel nou-născut, înainte și după ingerarea de colostru, față de serul antivacă, se verifică rezultatele obținute prin analiza figurilor 8 și 9. În cazul unor viței nou-născuți nu am identificat prezența liniei de precipitare γ'', fapt pe care îl atribuim fie unor variații individuale, fie faptului că apariția acestei linii de precipitare este în strînsă legătură cu sensibilitatea metodei. Credem că această problemă ar necesita un studiu mai amplu, în care să se ia în considerare și alte rase de bovine, deoarece în cercetările noastre, deși vițeii proveneau de la vaci de rasă brună, într-un număr mic de cazuri nu am cunoscut puritatea rasei.

Într-o variantă experimentală în care am urmărit comportarea imunoelectroforetică a serului de vițel nou-născut, față de serul antiimunoglobulinic, comparativ cu serul de vacă (fig. 11), am constatat că serul vițelului nou-născut prezintă față de serul antiimunoglobulinic o linie de precipitare în zona albuminelor. Această linie arată prezența în serul antiimunoglobulinic a unor anticorpi față de un antigen sanguin, fapt arătat și la analiza liniilor de precipitare din figurile 2 și 3. Prezența acestei linii nu impietează cercetările noastre privind γ-globulinele. În rest, vițelul nou-născut nu conține antigeni care pot fi recunoscuți de serul antiimunoglobulinic. Dacă comparăm acest fapt cu un ser de vițel după ce acesta a ingerat colostru (tip 12 și 13), constatăm că serul antiimunoglobulinic precipită aceleași fracțiuni ca și în cazul serului de vacă. Acest antiser poate deci să precipite atît γ-globulinele din serul de vacă (fig. 3), cît și imunoglobulinele ajunse din colostru în circuitul sanguin al vițelului și care, prin mobilitatea lor electroforetică, se identifică cu γ-globulinele [4], [8], [11]. Aceste rezultate ne îndreptățesc să presupunem existența unor relații de antigenitate între categoriile de proteine studiate. Dacă trecerea imunoglobulinelor colostrale prin membrana intestinală are loc sau nu cu modificări structurale, rămîne încă o problemă deschisă. Forma liniilor de precipitare obținute în figura 14 între serul antiimunoglobulinic și imunoglobulinele colostrale izolate, și între acest antiser și serul de vițel după ingestia de colostru, arată mai curînd o trecere a imunoglobulinelor fără modificări esențiale în structura lor antigenică. Aceste observații pledează pentru trecerea imunoglobulinelor colostrale prin

peretele intestinal al vițeilor nou-născuți și ajungerea lor în sînge fără modificări în structura lor antigenică. Totodată aceste observații pot constitui un punct de plecare pentru explicarea mecanismului acestui fenomen.

CONCLUZII

1. Analiza imunoelectroforetică a serului sanguin de vacă și a imunoglobulinelor colostrale izolate din zerul de colostru a arătat existența unor relații de antigenitate între γ-globulinele serice și imunoglobulinele colostrale.

2. La vițelul nou-născut, imaginea imunoelectroforetică arată absența liniei de precipitare a γ-globulinelor și a unei fracțiuni din zona β-globulinelor.

3. După ingestia de colostru, linia γ-globulinelor se poate identifica la un interval foarte scurt (1—2 ore) în sîngele vițelului nou-născut. Fracțiunea β'' din zona β-globulinelor continuă să fie absentă și după ingerarea colostrului.

4. Rezultatele obținute prin mai multe variante experimentale ne îndreptățesc să presupunem că se păstrează relații de antigenitate între γ-globulinele serice de vacă și imunoglobulinele colostrale, după trecerea acestora prin pereții intestinali ai vițelului, și că γ-globulinele ce apar astfel în sîngele acestuia în primele 24 de ore de viață ar fi, de fapt, imunoglobuline colostrale nemodificate.

5. Metoda de izolare a imunoglobulinelor colostrale cu rivanol nu asigură o puritate satisfăcătoare a preparatului obținut. Analiza imunoelectroforetică pune în evidență fracțiuni de β-lactoglobulină, α-lactalbumină și urme de proteine serice.

Prezentată la redacție
la 17 februarie 1964

*Laboratorul de biochimie al
Institutului de cercetări zootehnice și
Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București*

BIBLIOGRAFIE

1. R. G. Hansen, P. H. Phillips, *Studies on proteins from bovine colostrum*, J. Biol. Chem., **171**, 223 (1947).
2. B. L. Larson, D. C. Gillespie, *Origin of the major specific proteins in milk*, J. Biol. Chem., **227**, 565 (1957).
3. B. L. Larson, *Transfer of specific blood serum proteins to lacteal secretions near parturition*, J. Dairy Sci., **41**, 1033 (1958).
4. D. Gh. Popovici, V. V. Micușan, *Cercetări asupra fracțiunilor proteice din sîngele matern, din sîngele noului născut și din colostru la capre*, St. cerc. biochimie, **VI**, 39 (1963).
5. E. Gugler, C. von Muralt, *Über immunelektrophoretische Untersuchungen an Frauenmilch-Proteinen, 2 Mitt.*, Schweiz. Med. Wschr., **89**, 925 (1959).
6. L. A. Hanson, B. Johansson, *Immune electrophoretic analysis of bovine milk and purified bovine milk protein fractions*, Experientia, **XV**, 377 (1959).
7. L. A. Hanson, *Immunological analysis of bovine blood serum and milk*, Experientia, **XV**, 471 (1959).

8. L. E. Smith, *The immune proteins of bovine colostrum*, J. Biol. Chem., **164** (1946).
9. F. W. R. Brambell, *The passive immunity of the young mammalian*, Biol. Rev., 33, 120 (1958).
10. D. Popovici, N. Vermeșanu, G. Jurencova, V. Micușan, T. Bîlbîie, *Dinamica compoziției chimice a colostrului și influența acesteia asupra proteinemiei la viței*, Lucr. șt. I.C.Z., **XXI**, 301 (1964).
11. L. E. Smith, A. Holm, *The transfer of immunity to the new-born calf from colostrum*, J. Biol. Chem., **175**, 349 (1948).
12. K. A. Kaeckenbeeck, G. Colinet, F. Schoenaers, *Evolution de l'aptitude de l'intestin du veau nouveau-né à résorber les anticorps apportés par le colostrum*, Ann. méd. vétérin., **105**, 197 (1961).
13. R. S. Comline, H. E. Roberts, D. A. Titchen. *Route of absorption of colostrum globulin in the new-born animal*, Nature, **167**, 561 (1951).
14. E. Balafour, R. S. Comline, *The specificity of the intestinal absorbtion of large molecules by the new-born calf*, J. Physiol., **148**, 778 (1959).
15. H. F. Deutsch, V. R. Smith, *Intestinal permeability to proteins in the new-born herbivore*, Am. J. Physiol., **191**, 271 (1957).
16. V. R. Smith, E. S. Ervin, *Absorbtion of colostrum globulins introduced direct by into the duodenum*, J. Dairy Sci., **42**, 364 (1959).
17. E. Jamerson, C. Alvarez-Tostado, H. Sorter, *Electrophoretic studies in new-born calf serum*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **51**, 163 (1942).
18. J. H. Graves, *Transfer of neutralizing antibody by colostrum to calves born of foot and mouth disease vaccinated dams*, J. Immunol., **91**, 251 (1963).
19. P. Johnson, A. Pierce, *Ultracentrifugal and electrophoretic studies on neonatal calf serum and maternal colostrum*, J. Hyg. Camb., **57**, 304 (1959).
20. F. Steck, *Untersuchungen über die Gammaglobulinresorbtion des neugeborenen Kalbes mit Hielf von Immunpräzipitationsmethoden*, Pathol. et Microbiol., **24**, 963 (1961).
21. A. E. Kenyon, R. K. Anderson, R. Jennes, *Isolation of immune globulins from milk and colostrum with rivanol*, J. Dairy Sci., **42**, 1 233 (1959).
22. S. M. Idu, S. Cîmpeanu, *Electroforeza*, București, Edit. medicală, 1957.
23. Ö. Ouchterlony, *Diffusion-in-gel methods for immunological analysis*, Progr. Allergy, **5**, 1 (1958).
24. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
25. P. Grabar, P. Burtin, *Analyse immunoélectrophorétique. Applications aux liquides biologiques humains*, Paris, Masson et Cie, 1960.
26. J. Nicolet, *Étude immunoélectrophorétique du lait dans les divers types de mammites*, Milchwissenschaft, *6*, 307 (1962).
27. L. A. Hanson, *Comparative immunological studies of the immune globulins of human milk and of blood serum*, Int. Arch. Allergy, **18**, 241 (1961).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 221–228, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

ELECTROFOREZA PREPARATIVĂ ÎN GEL DE AGAROZĂ

DE

D. MOȚET și V. GHEȚIE

Rezumat. — Analiza se poate efectua într-un aparat uzual de electroforeză analitică în gel, la temperatura camerei și fără schimbarea continuă a tamponului. Separarea fiind superioară, se pot astfel obține fracțiuni electroforetice de o puritate avansată. Proteinele pot fi eluate din gelul de agaroză prin extracție simplă, fără denaturare. Extracția proteinelor, în special a celor bazice, se face cu un randament mai bun decît din gelul de agar. Proteinele eluate pot fi eliberate de impuritățile de agaroză prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

Electroforeza preparativă în zonă se practică în mod curent pe hîrtie și în bloc de amidon. Ambele metode prezintă însă o serie de dezavantaje : hîrtia de filtru adsoarbe ireversibil cantități însemnate de proteină și necesită pentru electroforeza continuă o aparatură specială, iar blocul de amidon nu se poate folosi la separarea substanțelor cu greutate moleculară sub 30 000, deoarece acestea intră în granulele amidonului și nu migrează liber. În plus, blocul de amidon cere manipulări foarte precise, iar succesul separării depinde foarte mult de tehnica și experiența cercetătorului [1].

Deși gelul de agar nu prezintă aceste dezavantaje, el este puțin folosit la electroforeza preparativă, deoarece nu permite eluția cantitativă a proteinelor. Dificultățile sînt cauzate de grupările acide, încărcate electric, ale agarului, care adsorb proteinele, mai ales pe cele bazice. Pentru eluție sînt necesare, din acest motiv, tehnici speciale, ca electrodecantarea și comprimarea la decongelare [2]. Ultima tehnică, mai simplă, poate determina însă denaturarea proteinelor, datorită înghețărilor și dezghețărilor succesive [3].

În ultimii ani, la electroforeza analitică și imunoelectroforeză s-a propus utilizarea agarozei [4], component principal al agarului, lipsit de grupări acide, încărcate electric [5]. Comparate cu agarul, gelurile de agaroză nu prezintă practic electroendosmoză [4], [6], adsorb mai puțin proteinele și compușii micromoleculari [4], au o capacitate de rezoluție electroforetică mai mare [6] și permit formarea unor linii de imunoprecipitare mai ușor de interpretat [6], [7].

Aceste calități ale agarozei ne-au determinat să încercăm utilizarea gelului și la electroforeza preparativă. Agaroza a mai fost întrebuințată la electroforeza preparativă în coloană de J. Porath și S. Hjertén [8], însă nu sub formă de gel, ci de suspensie. Gelul de agaroză, prin proprietățile enumerate mai sus, prezenta bune perspective pentru realizarea unei tehnici de electroforeză preparativă simple și eficiente, la îndemîna oricărui laborator.

SEPARAREA FRACȚIUNILOR ÎN GEL DE AGAROZĂ ȘI AGAR

Analizele electroforetice s-au efectuat la temperatura camerei, în cuve cu o capacitate de aproximativ 800 ml, folosite și la electroforeza analitică în gel. Tamponul folosit (tris-EDTA-borat [9], pH = 8,5, puterea ionică în cuvă 0,08, în plăci 0,027) nu a fost schimbat în timpul electroforezei. Plăcile de sticlă, de 6 × 15 cm, au fost introduse în cutii de 7 × 16 cm, cu un perete rabatabil, fixat cu leucoplast și etanșat cu parafină. După răcire la 50—60°C, gelul a fost turnat în cutie peste plăci, astfel încît deasupra acestora să se formeze un strat de 1 cm grosime. După întărire, gelul se secționează cu un bisturiu, urmînd marginile plăcii. Se desface apoi peretele rabatabil al cutiei și se scot plăcile. Concentrația de agar, respectiv agaroză în gel a fost de 1,5%.

Deoarece în gelul de agaroză curentul de electroendosmoză este slab, șanțul de aplicare, cu o lățime de 0,5 cm, nu se face la mijlocul plăcii, ca la gelul de agar, ci la o treime de la marginea care va fi așezată către polul negativ al aparatului. Se mărește astfel pista de migrare, ceea ce permite să se obțină separări mai înaintate. În șanțurile de aplicare s-au introdus 2,5 ml ser sanguin uman amestecat cu gel (v/v). Pentru cantități mai mari se pot folosi plăci mai late.

Gelul a fost legat cu tamponul din cuvă prin intermediul unor benzi de sugativă. Peste gel s-a aplicat o foaie de polietilenă subțire, avînd grijă să se elimine prin presare ușoară orice bulă de aer. Deasupra s-a așezat o placă de sticlă.

S-a folosit o cădere de potențial de 9 V/cm și o intensitate de 1,9 mA/cm. Timpul de migrare a fost de 20 de ore. În acest interval de timp, pe plăcile de agaroză proteinele serice s-au etalat pe o distanță de 10 cm, în timp ce pe plăcile cu agar migrarea a fost de numai 5—6 cm, producîndu-se totodată o prăbușire accentuată a gelului.

Gelul a fost tăiat apoi în secțiuni de cîte 3 mm lățime, cu ajutorul unui tăietor confecționat dintr-o ramă de lemn pe care se întind fire de sîrmă subțire, așezate echidistant la 3 mm unul de altul. S-au introdus apoi secțiunile în eprubete de centrifugă și s-a trecut la extragerea fracțiunilor proteice. În acest scop, fiecare secțiune s-a mărunțit în 2 ml ser

fiziologic și s-a agitat timp de 1 oră. Probele au fost apoi înghețate cu un amestec de zăpadă carbonică și etanol (−70°C) și s-au centrifugat 1 oră la 2500 *g*. Proteinele extrase în supernatant s-au dozat spectrofotometric sau prin metoda Lowry modificată [10]. Prin ambele metode se obține o curbă electroforetică cu alură identică.

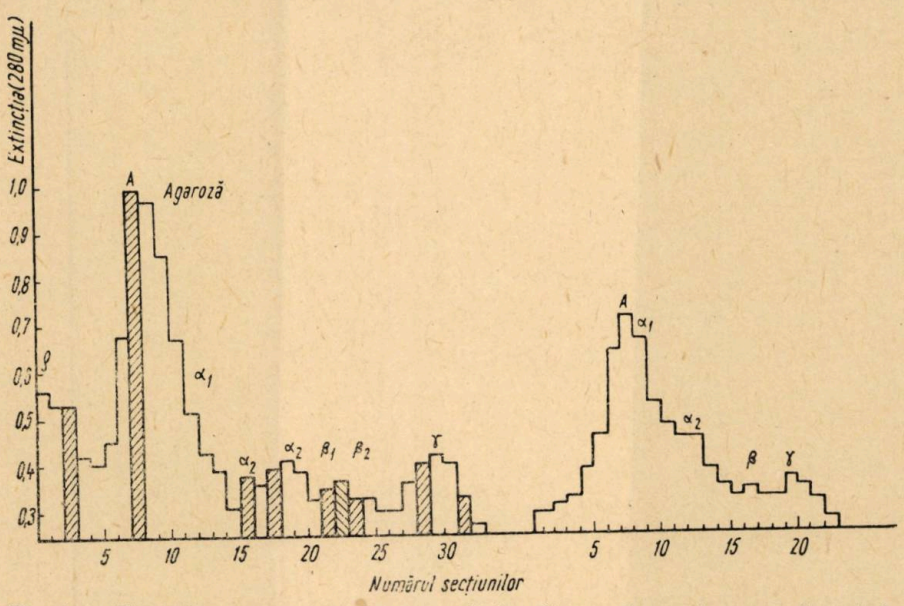


Fig. 1. — Electroforeza preparativă a proteinelor din serul sanguin uman în gel de agaroză și agar. Secțiunile haşurate au fost analizate imunoelectroforetic.

Curbele obținute arată că și în strat gros agaroza își păstrează față de agar o netă superioritate în ceea ce privește puterea de rezoluție electroforetică (fig. 1).

PURITATEA FRACȚIUNILOR

Separarea mai bună permite obținerea fracțiunilor electroforetice într-un grad de puritate înaintat.

Verificarea purității fracțiunilor extrase am efectuat-o prin imunoelectroforeză, folosind un ser imun de iepure antiom, cu titrul ridicat (1/50 000). S-a folosit micrometoda Scheidegger [11], analiza fiind efectuată în plăci de 6 × 8 cm. Gel de agaroză 1,5 g%, potențial 10 V/cm, intensitate 0,8 mA/cm, durata 2 ore. Tampon veronal-veronal sodic pH = 8,6, putere ionică în cuvă 0,05, în plăci 0,016. Imunodifuzia s-a făcut la temperatura camerei, timp de 24 de ore, după care plăcile s-au spălat cu ser fiziologic 48 de ore, cu schimbarea repetată a soluției de spălare. După uscare s-a făcut colorarea plăcilor cu azocarmin B.

Secțiunile au fost luate din zona prealbuminei (3), albuminei (8) α_2-globulinei (16, 18), β-globulinei (22, 23,25) și γ-globulinei (29, 32). Rezultatele sînt înfățișate în figura 2.

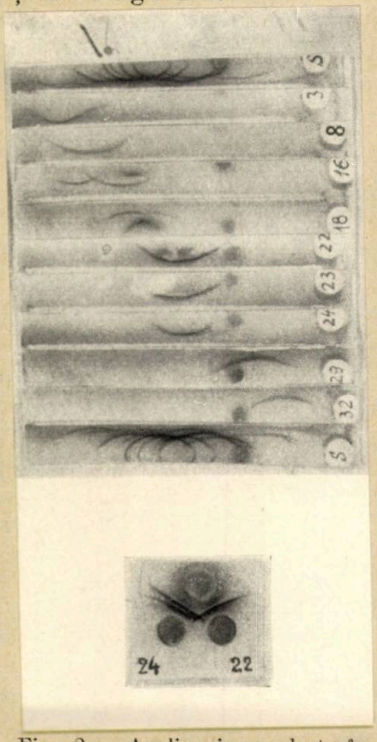


Fig. 2. — Analiza imunoelectroforetică a proteinelor din secțiunile nr. 3, 8, 16, 18, 22, 23, 24, 29, 32, obținute prin electroforeza preparativă a serului sanguin uman pe gel de agaroză.
Ser de iepure antiom (titrul 1/50 000). Tehnica Scheidegger [11]. Gel de agaroză, 1,5g%. Potențial 10 V/cm, intensitate 0,8 mA/cm. Durata, 2 ore. Imunodifuzia la temperatura camerei, 24 de ore. Colorație cu azocarmin.

Proteinele extrase din secțiunile 22 și 24 au un caracter antigenic distinct. Dubla difuzie (Outoherlony) prezintă linii de precipitare care se întretaie (fig. 2).

EXTRACTIBILITATEA PROTEINELOR DIN GELUL DE AGAROZĂ ȘI AGAR

Pentru cercetarea extractibilității proteinelor din gel am recurs la următorul model experimental: s-a adăugat 1 ml soluție de ser fiziologic conținînd 10 mg proteine, la un volum egal de ser fiziologic conținînd

agar, respectiv agaroză, în concentrație de 3 g% (la 45°C). După întărirea gelului, extracția se face în două variante :

a) Metoda compresării în momentul decongelării [2]. Se introduce gelul într-o eprubetă de centrifugă și se îngheață într-un amestec de zăpadă carbonică și etanol. Se centrifughează apoi 30 min la 5 000 *g*. Se decantează lichidul eliberat prin centrifugare. Peste materialul rămas se adaugă 2 ml ser fiziologic, se sfărîmă gelul, se îngheață din nou și se centrifughează 30 min la 5 000 *g*. Supernatantul obținut a fost amestecat cu cel rezultat din prima centrifugare.

b) Extracție directă. La cei 2 ml gel se adaugă 2 ml ser fiziologic, se sfărîmă gelul și se lasă 1 oră la extracție, sub agitare. Se centrifughează apoi 30 min la 5 000 *g*. Supernatantul a fost decantat, iar extracția a fost repetată încă o dată, tot cu 2 ml ser fiziologic. Se adună cele două supernatante.

În supernatantele obținute se dozează proteinele, prin metoda Lowry modificată [10], folosind curbe-etalon obținute cu fiecare dintre proteinele testate (albumina serică bovină, proteina serică umană și proteina citoplasmatică din ficatul de șobolan). Proteina citoplasmatică din ficat ne-a fost pusă la dispoziție de C. Șelariu. Ea a fost preparată prin centrifugarea omogenatului total în zaharoză 0,25 M, la 14 000 g și apoi la 105 000 g, pentru îndepărtarea formațiunilor intracelulare (mitocondrii, microzomi). Rezultatele obținute sînt prezentate în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Recuperarea proteinelor din gelurile de agaroză și agar (în % din cantitatea totală introdusă)

Proteina eluată	Extracție simplă		Compresare la decongelare	
	agar	agaroză	agar	agaroză
Albumină serică bovină	54	88	92	96
Proteină serică umană	64	96	96	98
Proteina citoplasmatică din ficatul de șobolan	36	60*	38	60

* Prin extracție cu tampon Michaelis izotonic, pH = 8,5, se poate elua 90% din proteina citoplasmatică.

Datele tabelei duc la următoarele concluzii :

a. Gelul de agar nu permite eluarea proteinelor în cantitate satisfăcătoare prin extracție simplă. Nici chiar comprimarea la decongelare nu dă randamente satisfăcătoare în cazul proteinelor bazice (proteina citoplasmatică din ficat).

b. Din gelul de agaroză proteinele pot fi recuperate cu randamente mari prin extracție simplă. Nu mai este necesară eluția prin comprimare la decongelare, ceea ce elimină posibilitatea denaturării proteinelor. În plus, agaroza permite recuperarea mai bună a proteinelor bazice. În aceste cazuri randamentul eluției se poate îmbunătăți, folosind un extractant cu un pH mai alcalin.

În afara proteinelor indicate în tabel, am cercetat și extractibilitatea unor proteine citoplasmatice vegetale și a γ-globulinei umane. Și în aceste

cazuri recuperările au fost mai bune din agaroză. Rezultă clar că gelul de agaroză este un mediu de electroforeză din care proteinele pot fi recuperate în cantități mai mari, printr-o tehnică mai simplă și mai „blîndă".

PURIFICAREA ELUATELOR

Toate metodele electroforetice care folosesc ca medii de suport polizaharidele (amidonul, agarul și agaroza) au dezavantajul că eluatele se impurifică cu urme de polizaharid. Pentru agar și agaroză noi am stabilit că impuritățile ating pînă la 1,5 mg/ml. Impuritățile stînjenesc determinarea spectrofotometrică a proteinelor (măresc extincțiile) și nu permit determinarea conținutului în polizaharide al proteinei eluate. Determinările spectrofotometrice pot fi folosite însă pentru trasarea curbelor electroforetice, deoarece impurificarea cu agaroză este identică în aceleași condiții de extracție.

Am încercat să îndepărtăm impuritățile de agaroză prin filtrare peste gel de Sephadex G—50 (granulație medie), eluînd cu ser fiziologic o coloană încărcată cu un amestec de albumină serică umană și agaroză. Rezultatele nu au fost însă satisfăcătoare.

Purificarea eluatelor este realizabilă prin cromatografie pe DEAE-celuloză. pH-ul și puterea ionică a tamponului folosit la eluție se aleg astfel ca proteina cercetată să se fixeze pe schimbător, iar agaroza, neîncărcată electric, să iasă din coloană în primele fracțiuni colectate. După

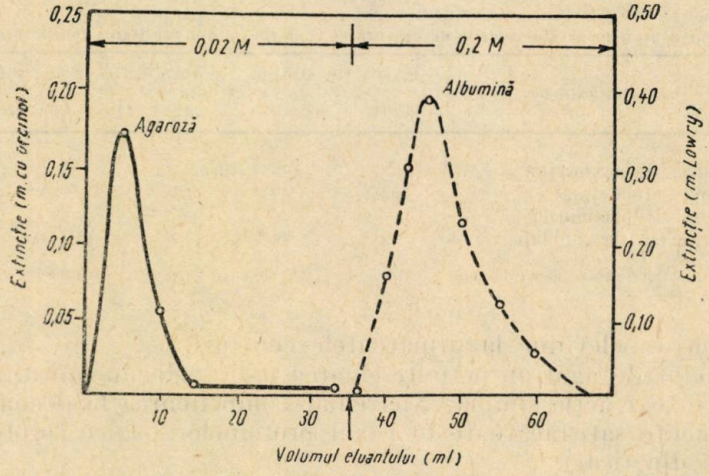


Fig. 3. — Cromatografia pe DEAE-celuloză a unui amestec de albumină serică umană și agaroză. Proteinele s-au dozat prin metoda Lowry modificată [10], iar agaroza prin reacție cu orcinol [12].

îndepărtarea agarozei, se schimbă pH-ul sau puterea ionică a tamponului, astfel ca proteina dată să se desfacă de pe schimbător și să poată fi recuperată cantitativ.

Aplicînd acest principiu la un amestec de albumină serică umană și agaroză, am reușit să separăm complet aceste două componente (fig. 3).

Am folosit o coloană cromatografică de 8/1 cm, umplută cu DEAE-celuloză și echilibrată cu tampon fosfat 0,02 M, de pH 8,0. S-a încărcat coloana cu 10 mg proteină și 1,5 mg agaroză, dizolvată în 1 ml soluție. Eluția s-a făcut cu tamponul folosit la echilibrare. Cînd întreaga cantitate de agaroză a părăsit coloana, s-a mărit concentrația tamponului pînă la 0,2 M, eluînd astfel albumina serică. Aceste experiențe arată că agaroza poate fi îndepărtată integral din eluate, dacă obiectivele cercetării o cer.

CONCLUZII

Agaroza poate fi folosită cu succes ca mediu suport în electroforeza preparativă, avînd următoarele avantaje :

1. Analiza se poate efectua într-un aparat uzual de electroforeză analitică în gel, nu necesită schimbarea continuă a tamponului și se efectuează la temperatura camerei.

2. Permite o fracționare mai avansată a proteinelor decît agarul. Se pot astfel obține fracțiuni electroforetice mai pure.

3. Proteinele pot fi eluate din gelul de agaroză prin extracție simplă. În acest fel se reduce la minimum riscul denaturării lor. Extracția proteinelor, în special a celor bazice, se face cu un randament mai bun decît din gelul de agar.

4. Proteinele eluate pot fi eliberate de impuritățile de agaroză prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

Prezentată la redacție
la 17 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. H. G. Kunkel, R. Trautman, *Zone electrophoresis in various types of supporting media*, în *Electrophoresis* sub red. M. Bier. Acad. Press. Inc. Publ., cap. 6, 225–262 (1959).
2. L. A. Zilber, G. I. Abelev, *Virusologhia i immunologhia raka*, Moscova, Medghiz, 383–392 (1962).
3. F. W. Putnam, *Protein denaturation*, în H. Neurath și K. Bailey, *The Proteins*, New York, Acad. Press, I B, 8–17 (1953).
4. S. Hjertén, *Agarose as an anticonvectional agent in electrophoresis*, Biochim. biophys. Acta, **53**, *3*, 518 (1961).
5. C. Araki, *Structure of the agarose constituent of agar-agar*, Bull. Chem. Soc. Japan, **29**, 543 (1956).
6. V. Ghetie, D. Motet-Grigoras, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, St. cerc. biochimie, **5**, *3*, 409 (1962).
7. S. Brishammar, S. Hjertén, B. Hofsten, *Immunological precipitates in agarose gels*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, *3*, 518 (1961).
8. J. Porath, S. Hjertén, *Some recent developments in column electrophoresis in granular media*, în *Methods of Biochemical Analysis* sub red. D. Glick, **9**, 193 (1962).
9. G. Biserte, P. Paysant, R. Havez, A. Racadot, *Intérêt du tampon „Tris-EDTA-borate" (TEB) pour l'electrophorèse sur papier des sérums normaux et pathologiques*, Ann. Biol. Clin., **28**, *10–12*, 603 (1960).
10. G. L. Miller, *Protein determination for large numbers of samples*, Analyt. Chem., **31**, 964 (1959).
11. J. J. Scheidegger, *Une micro-méthode de l'immuno-électrophorèse*, Int. arch. allergy, **7**, 103 (1957).
12. N. W. Pine, *Some chemical methods for the detection and rough estimation of agar in biological materials*, Brit. J. Exp. Pathol., **17**, 269 (1936).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 229–236, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

REACTIVITATEA BIOCHIMICĂ ȘI IMUNOLOGICĂ A MACROFAGULUI HISTIOID ÎN TUBERCULOZĂ

I. ACTIVITATEA DEHIDROGENAZICĂ ȘI FOSFATAZICĂ

DE

EUG. PĂUNESCU și ECATERINA HADÎRCĂ

Rezumat. — S-a cercetat comparativ, la animale (cobai și iepuri) normale și vaccinate cu 10 mg B.C.G., activitatea dehidrogenazică și fosfatazică a macrofagelor din exsudatul peritoneal de 8—12 zile de la inocularea intraperitoneală de lipide bacilare acetonosolubile, constatîndu-se o intensificare a proceselor enzimatice la animalele imunizate.

Intensificarea activității enzimatice interesează fosfataza acidă și — dintre enzimele dehidrogenante — în special glicerofosfat-dehidrogenaza și glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza, care reprezintă mecanisme metabolice esențiale, contribuind în mod direct la creșterea rezistenței celulare la infecție.

Activitatea crescută a fosfatazei acide la macrofagele histioide provenite de la animalul vaccinat cu B.C.G., reflectă o eficiență fagocitară mai mare a acestor celule. Intensificarea activității glicerofosfat-dehidrogenazei indică un potențial crescut al acestor celule de a metaboliza lipidele, iar creșterea activității glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei denotă o mărire a randamentului de formare a compușilor macroergici cu rol deosebit în procesele de fagocitare și detoxifiere celulară.

Cercetările privind mecanismele rezistenței naturale și dobîndite au arătat că, în tuberculoză, potențialul de apărare al organismului infectat este predominant de tip celular, imunității umorale specifice revenindu-i un rol secundar [1]. Dintre elementele celulare care participă la interacțiunea gazdă-parazit în această infecție, o atenție deosebită s-a acordat fagocitelor mononucleare și în special macrofagului histioid, care — prin potențialul său de mobilizare, prin plasticitatea sa particulară și prin deosebita sa capacitate de a inhiba dezvoltarea bacilului și de a realiza distrugerea acestuia — a fost considerat, încă de mult timp [2], cel mai important factor în mecanismul imunității la tuberculoză. Argumente puternice în acest sens au adus lucrările care au demonstrat, în culturi celulare, rezistența mai mare față de bacilul tuberculozei a macrofagului histioid provenit de la animalul imunizat contra tubercu-

lozei [3], [4], precum și lucrările care au arătat capacitatea histiocitului și a limfocitului de la animalul imunizat de a transfera pasiv rezistența celulară la un animal normal, neimunizat [5].

În ceea ce privește substratul biologic al rezistenței crescute a macrofagului provenit de la animalul imunizat, cercetările recente au fost îndreptate către studiul cantitativ al echipamentului enzimatic al acestor celule, deoarece intensificarea activității fagocitare a macrofagului histioid de la animalul rezistent sugerează o creștere concomitentă a activității enzimatice specializate. Inițial, asemenea cercetări au fost întreprinse de către Lurie și colab. [6], care au studiat activitatea enzimatică a macrofagului comparativ la iepuri cu diferite grade de *rezistență naturală* la tuberculoză. Mai recent, Colwell și colab. [7] au cercetat existența unor diferențe de activitate enzimatică între extractele de macrofage provenite de la animale cu rezistență naturală și cîștigată față de tuberculoză.

Cercetările lui Lurie și colab. au arătat că macrofagele provenite de la iepuri cu rezistență ereditară la tuberculoză prezintă, în general, o activitate enzimatică mai intensă decît aceea a macrofagelor provenite de la rase de iepuri cu sensibilitate mare sau moderată la tuberculoză. Această activitate enzimatică crescută interesează în special fosfataza acidă și unele dehidrogenaze (cele active față de : glucozo-*6*-fosfat, glicerofosfat, β-hidroxi-butirat, gliceraldehid-*3*-fosfat și acid glutamic) [6 *a*]. Rezultate parțial asemănătoare s-au obținut și în cazul iepurilor sensibili, vaccinați B.C.G. cu doze mici (1 mg microb semiumed inoculat intradermic) : o parte dintre celulele exsudatului peritoneal — recoltat la 5 zile de la inocularea intraperitoneală de ulei vegetal — au prezentat, comparativ cu elementele exsudatului de la iepurele nevaccinat, o creștere a activității fosfatazice și dehidrogenazice [6 *b*]. Provocarea experimentală de hipertiroidism (prin administrare intramusculară zilnică, timp de 9 zile, de 40 μg triiodotironină) duce la o masivă activare a enzimelor macrofagelor peritoneale, spre deosebire de hipotiroidie (obținută prin ablația tiroidei), care are un efect invers [6 *c*].

Colwell și colab. studiază comparativ activitatea enzimatică (fosfataza, glucuronidaza, lizozimul, tributirinaza) a extractelor de mononucleare din exsudatul peritoneal (obținut sub acțiunea glicogenului) de la șobolan și cobai normali și vaccinați cu B.C.G. Autorii constată o activitate enzimatică diferențiată, în funcție de rezistența naturală a animalului de experiență față de tuberculoză. Șobolanul (specie rezistentă) prezintă o activitate enzimatică mai intensă și mai complexă, interesînd în special acțiunea lizozimului și a β-glucuronidazei. Autorii acordă o atenție specială β-glucuronidazei, deoarece — așa cum constată în cercetările întreprinse — activitatea acestei enzime este inhibată la animalele sensibile (cobai normali) de prezența în sistemul de reacție a unui extract apos total de bacil al tuberculozei care are calități imunizante și prezintă o reacție Molisch (pentru polizaharide) intens pozitivă. Dimpotrivă, activitatea β-glucuronidazică a extractelor macrofagice provenite de la animale rezistente la tuberculoză (șobolani și cobai vaccinați B.C.G.) nu este inhibată prin adăugarea extractului bacilar la sistemul de reacție.

Această constatare, care arată pierderea sensibilităţii unor enzime faţă de componentele bacilare citotoxice, concomitent cu creşterea rezistenţei întregului organism faţă de infecţia tuberculoasă, confirmă — pe un alt plan — rezultatele unor cercetări anterioare ale noastre [8], privind succin-dehidrogenaza tisulară. În omogenate de ficat şi de rinichi provenite de la cobai normali, activitatea succin-dehidrogenazică este net inhibată dacă animalul primeşte o inoculare de lipide bacilare solubile în eter de petrol şi acetonă; dimpotrivă, administrarea lipidului citotoxic la animalul în prealabil vaccinat cu B.C.G. nu provoacă o inhibiţie similară a activităţii succin-dehidrogenazice. În acelaşi sens, investigaţii anterioare [9] ne-au arătat că potenţialul enzimatic bactericid (lizozimul şi ribonucleaza acidă) al microfagelor provenite de la cobaiul vaccinat cu B.C.G. este mai puţin afectat de prezenţa lipidului bacilar acetonosolubil decît în cazul cînd polinuclearele provin de la cobaiul normal, sensibil la infecţia tuberculoasă.

★

Ansamblul acestor studii pune problema corelaţiei dintre diferitele tipuri de reactivitate a macrofagului histioid (MH) şi procesele de rezistenţă în tuberculoză. Pentru cunoaşterea mecanismului intim al multiplelor aspecte ale acestei corelaţii, credem că — în prezent — trebuie întreprinse cercetări care să evidenţieze deosebirile de ordin biochimic şi imunologic dintre MH provenite de la organisme sensibile la tuberculoză şi cele provenite de la organisme cu rezistenţă crescută faţă de infecţia tuberculoasă.

Cercetările noastre întreprinse în acest scop s-au desfăşurat în paralel la animale normale şi vaccinate cu B.C.G., pentru a putea aprecia rolul imunizării dobîndite asupra capacităţii reactive a MH în tuberculoză.

Într-o primă etapă am studiat activitatea dehidrogenazică, deoarece aceasta reflectă, în general, intensitatea proceselor de oxidoreducere celulară, dînd astfel o imagine de ansamblu asupra schimburilor metabolice intracelulare. Printre dehidrogenazele studiate au fost incluse şi glucozo-*6*-fosfat-dehidrogenaza şi glicerofosfat-dehidrogenaza, care deţin un rol deosebit în procesele de detoxifiere celulară şi, respectiv, în catabolismul lipidelor. Am studiat de asemenea şi activitatea fosfatazei acide a MH, deoarece acţiunea acestei enzime este în corelaţie directă cu capacitatea fagocitară a celulelor specializate [10].

MATERIAL ŞI METODĂ

Animalele folosite pentru obţinerea exsudatului peritoneal (iepuri de 2 700—3 800 g şi cobai de 390—520 g) au fost împărţite în două loturi: martori şi vaccinaţi cu B.C.G. Administrarea vaccinului B.C.G. s-a făcut pe cale intraperitoneală, cu 6—10 săptămîni înainte de prepararea exsudatului, folosindu-se intenţionat doze mari de vaccin: 10 mg microb semiuscat pentru un cobai şi 40—50 mg pentru un iepure.

Pentru fiecare experienţă s-au utilizat exsudate peritoneale provenind de la 3—6 iepuri sau de la 5—14 cobai, pentru fiecare lot.

Macrofagele histioide (MH) au fost obţinute din exsudatul peritoneal recoltat cu soluţie cloruro-sodică izotonă şi heparinată (10 μg/ml), la 8—12 zile de la inocularea intraperitoneală de 2—3 ml dintr-o suspensie salină de extract bacilar acetonosolubil (2 mg/ml). Lichidul recoltat steril a fost centrifugat 12 minute la 1 000 t/min; centrifugatul a fost reluat în baloane sterile şi omogenizat cu soluţie salină izotonă.

Densitatea elementelor în suspensia astfel obţinută a fost apreciată prin numărarea celulelor.

Compoziţia suspensiei celulare a fost apreciată prin stabilirea unei formule procentuale a diferitelor elemente componente, prin examinarea a 200—300 de elemente de pe frotiul suspensie, fixat şi colorat cu May-Grünwald-Giemsa. Formulele astfel stabilite au arătat variaţii individuale în limite relativ largi, însă cu predominanţa practic absolută a elementelor mononucleare, atît în exsudatul de la cobai cît şi în cel de la iepuri:

	Exsudat provenit de la	
Elementele componente	*animal normal*	*animal vaccinat cu B.C.G.*
Macrofage	35—55	40—66
Limfocite mari şi mijlocii	20—40	20—28
Limfocite mici (reticulocite?)	15—26	18—32
Polinucleare	3	2

Activitatea dehidrogenazică a fost apreciată prin metoda de reducere a clorurii de trifenil-tetrazoliu, descrisă în lucrări anterioare [11]. Ca substrate am folosit: malatul, glicerofosfatul, glutamatul, succinatul şi glucozo-*6*-fosfatul. Concentraţia substratelor a fost 0,02 M, în tampon fosfat M/15 la pH 7,0, cu excepţia glucozo-*6*-fosfatului, care — fiind sub formă de sare de bariu — a fost dizolvat în tampon tris-(hidroxi-metil)-aminometan (M/15 şi pH 7,0). Soluţia-substrat de glicerofosfat a fost realizată cu ajutorul unui amestec în părţi egale de α- şi β-glicerofosfat.

Rezultatele obţinute au fost exprimate în μg formazan format în 60 de minute de echivalentul a un milion de celule din suspensie.

Activitatea fosfatazică a fost apreciată prin determinarea (cu metoda colorimetrică Briggs) a cantităţii de fosfor anorganic (*Pa*) liberat de enzimă (suspensia de MH) dintr-un fosfat organic, folosit ca substrat [12]. Drept soluţie-substrat am folosit un amestec în părţi egale de α- şi β-glicerofosfat de sodiu, în concentraţie totală de 0,652 g la 100 ml tampon ftalat M/15 cu pH 5,4; această soluţie conţine 1 mg fosfor organic într-un mililitru.

Activitatea fosfatazei alcaline (*fosfomonoesteraza I*) [13] nu a fost investigată, deoarece enzima nu a fost pusă în evidenţă în macrofagele de la iepure şi cobai [6*a*] [7].

Rezultatele obţinute au fost exprimate în μg *Pa* liberat în 18 ore de echivalentul a un milion de celule din suspensie.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Activitatea dehidrogenazică

În tabela nr. 1 se prezintă rezultatele investigaţiilor privind valoarea comparativă a activităţii dehidrogenazice a MH provenite de la animale normale şi vaccinate cu B.C.G.

După cum se observă din această tabelă, intensitatea activității dehidrogenazice a macrofagelor provenite de la animalul vaccinat cu B.C.G. este în general mai accentuată decît aceea a macrofagelor provenite de la animalul normal, sensibil la tuberculoză; acest proces se observă atît la iepure cît şi la cobai.

Tabela nr. 1

Activitatea dehidrogenazică a suspensiilor de MH provenite de la animale normale şi vaccinate cu B.C.G. (în μg formazan produs în 60 de minute de echivalentul a un milion de celule conţinute în probă)

Substratul	MH de la iepuri		MH de la cobai	
	normali	vacc. B.C.G.	normali	vacc. B.C.G.
Malat	1,01±0,005	1,4 ±0,008	1,13±0,06	1,2 ±0,1
Glicerofosfat	0,77±0,05	1,53±0,015	0,68±0,05	1,47±0,03
Glutamat	1,17±0,038	1,76±0,01	1,42±0,03	1,49±0,018
Succinat	0,98±0,038	1,29±0,038	1,02±0,088	1,16±0,01
Glucozo-6-fosfat	0,72±0,005	1,87±0,003	0,63±0,02	1,76±0,11

Diferenţele cele mai nete se constată însă în cazul activităţii glicerofosfat-dehidrogenazei şi glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei care — în cazul celulelor provenind de la animalele vaccinate cu B.C.G. — prezintă valori duble faţă de cele ale macrofagelor animalului normal.

Intensificarea activităţii glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei denotă o creştere a capacităţii de utilizare a surselor energetice (hexoze), care — în cazul fagocitelor — constituie principalul izvor pentru formarea compuşilor macroergici, indispensabili proceselor de fagocitare şi digestie intracelulară. De asemenea, după cum a demonstrat Axelrod [14], produşii macroergici de tipul nicotinamid-adenin-dinucleotin-fosfatului (NADP), rezultaţi în cursul şuntului hexozo-monofosfat, sînt intens utilizaţi de celulă în procesele de detoxifiere. Acest fapt sugerează o mai mare capacitate de apărare a MH provenit de la animalul vaccinat cu B.C.G. contra unor substanţe cu acţiune citotoxică (cum sînt unele componente bacilare, în special lipo-polizaharidele). În acelaşi sens, se pot menţiona cercetările lui Allison [15], care demonstrează rolul special al glucozo-6-fosfat-dehidrogenazei în desfăşurarea proceselor care asigură rezistenţa eritrocitului la acţiunea nocivă a parazitului malariei.

În ceea ce priveşte glicerofosfat-dehidrogenaza, este bine stabilit astăzi că activitatea acestei enzime este în strînsă legătură cu capacitatea celulelor de a metaboliza lipidele [16]. Totodată, avînd în vedere că bacilul tuberculozei conţine un perete celular deosebit de bogat în lipide şi că elementelor sistemului reticulo-histiocitar le revine un important rol în metabolizarea şi eliminarea lipidelor din organism [17], intensificarea activităţii glicerofosfat-dehidrogenazei la macrofagele animalului vaccinat cu B.C.G. sugerează o eficienţă crescută a acestora în procesele de fagocitare a bacilului tuberculozei.

Activitatea fosfatazei acide

În tabela nr. 2 se prezintă rezultatele investigațiilor privind valoarea comparativă a activității dehidrogenazice a MH provenite de la animale normale și vaccinate cu B.C.G.

După cum se observă în această tabelă, atît în cazul cobailor cît și al iepurilor, MH provenite de la animalele a căror rezistență față de

Tabela nr. 2

Activitatea fosfatazică acidă a suspensiilor de MH provenite de la animale normale și vaccinate cu B.C.G. (în μg *Pa* liberat în 18 ore de echivalentul a un milion de celule conținute în probă)

Activitatea fosfatazică	MH de la iepuri		MH de la cobai	
	normali	vacc. B.C.G.	normali	vacc. B.C.G.
μg *Pa* eliberat	11,55 ±1,09	23,85 ± 1,13	5,8 ±0,21	20,4 ±0,32
Semnificația diferenței $(M_1 + 3\sigma_1 < M_2 - 3\sigma_2)$	14,82<20,46		6,43<19,44	

infecția tuberculoasă a fost mărită prin vaccinarea cu B.C.G. prezintă o creștere semnificativă a activității fosfatazei acide.

În acest sens, Suter și Hulliger [18] au semnalat, încă din 1960, că activitatea fosfatazei acide a fagocitelor mononucleare obținute de la animalele vaccinate cu B.C.G. este mai mare decît aceea a celulelor similare obținute de la animalele normale. O intensificare a activității fosfatazice a fost semnalată și după o injecție de endotoxine, care provoacă o creștere a rezistenței generale față de infecții [19], inclusiv față de infecția tuberculoasă [20].

Datele — în aparență discordante — publicate de Colwell și colab. [7], care nu găsesc deosebiri semnificative în ceea ce privește activitatea fosfatazei acide între extractele de macrofage provenite de la cobai normali și cobai vaccinați cu B.C.G., trebuie puse atît pe seama deosebirilor de tehnică în realizarea vaccinării și a exsudatului peritoneal, cît și pe seama faptului că acești autori corelează activitatea enzimatică cu conținutul în proteine al extractelor de macrofage, pe care îl consideră nemodificat. Or, după cum am constatat noi, într-o analiză comparativă a compoziției chimice a extractelor macrofagice *, extractul de MH de la animalul vaccinat conține o cantitate mai mare de proteine decît cel de la animalul normal, creșterea interesînd o fracțiune care migrează electroforetic în zona albuminelor.

În ceea ce privește semnificația intensificării activității fosfatazei acide la macrofagele provenite de la animalul vaccinat, această intensificare trebuie considerată ca o mărturie a eficienței fagocitare crescute a acestor celule. În acest sens pledează lucrările lui Weiss și Fawcett [10], care — pe baza unui studiu metabolic efectuat în cursul desfășurării

* Datele respective vor fi publicate în nota a doua a prezentei lucrări.

proceselor fagocitare — ajung la concluzia că nivelul activității fosfatazei acide în celulele sistemului reticulo-histiocitar constituie reflectarea potențialului lor fagocitar.

CONCLUZII

Studiul macrofagelor obținute din exsudatul peritoneal — recoltat la 8—12 zile de la inocularea intraperitoneală de lipide bacilare acetonosolubile la cobai și iepuri — arată o intensificare a unor procese enzimatice în cazul macrofagelor provenite de la cobaii și iepurii vaccinați cu doze mari de B.C.G., comparativ cu activitatea macrofagelor de la animalele normale, sensibile la tuberculoză.

Intensificarea activităților enzimatice interesează fosfataza acidă și — dintre enzimele dehidrogenante — în special glicerofosfat și glucozo-*6*-fosfat-dehidrogenaza.

Activitatea crescută a fosfatazei acide la macrofagele histioide provenite de la animalul vaccinat cu B.C.G. reflectă o eficiență fagocitară mai mare a acestor celule. Intensificarea activității glicerofosfat-dehidrogenazei indică un potențial crescut al acestor celule de a metaboliza lipidele, iar creșterea activității glucozo-*6*-fosfat-dehidrogenazei denotă o mărire a randamentului de formare a compușilor macroergici cu rol deosebit în procesele de fagocitare și detoxifiere celulară.

În ansamblu, intensificarea activității dehidrogenazice și fosfatazice, în cazul macrofagului provenit de la animalul imunizat contra tuberculozei, reprezintă mecanisme metabolice esențiale, care contribuie în mod direct la creșterea rezistenței celulare la infecție.

Prezentată la redacție
la 30 ianuarie 1964

*Laboratorul de biochimie și fiziologie bacteriană
al Institutului clinic de ftiziologie, București*

BIBLIOGRAFIE

1. Eug. Păunescu, *Modificări enzimatice ale macroorganismului în cursul proceselor tuberculoase*, Ftiziologia, *1*, 47 (1961).
2. M. Lurie, *Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis*, J. exp. Med., **69**, 579 (1939).
3. J. Fong, P. Schneider, S. S. Elberg, *Studies on tubercle bacillus-monocyte relationship. I. Quantitative analysis on effect of serum of animals vaccinated with BCG, upon bacterium-monocyte system*, J. exp. Med., **104**, 455 (1956).
4. H. Schellenberg, *Wechselbeziehungen zwischen makroorganismischen Zellen und Mycobacterien in der Gewebekultur*, Beitr. klinik Tbk., **117**, 201 (1957).
5. J. Fong, D. Chin, S. S. Elberg, *Studies on tubercle bacillus-histiocyte relationship. V. Passive transfer of cellular resistance*, J. exp. Med., **115**, 475 (1962).
6. M. J. Allison, P. Zappasodi, M. B. Lurie, *Metabolic studies on mononuclear cells from rabbits of varying genetic resistance to tuberculosis*, Am. Rev. Resp. Dis., (*a*) **84**, *3*, 364 (1961); (*b*) **85**, *3*, 364 (1962); (*c*) **86**, *4*, 513 (1962).
7. C. A. Colwell, A. R. Hess, M. Tavaststjerna, *Mononuclear cells from animals of divergent susceptibility to tuberculosis. I. Enzyme studies*, Am. Rev. Resp. Dis., **88**, *1*, 37 (1963).

8. EUG. PĂUNESCU, *Corelaţii între rezistenţa la tuberculoză şi reactivitatea enzimatică a organismului. II. Acţiunea lipidelor bacilare asupra activităţii succin-dehidrazice tisulare*, Probleme de tuberculoză, Edit. Acad. R. P. R., 1961, vol. II, p. 137.
9. N. NASTA, EUG. PĂUNESCU, P. GEORGESCU, *Acţiunea unor componente ale bacilului tuberculozei, asupra potenţialului bactericid al polimorfonuclearelor cobaiului normal şi vaccinat B.C.G.*, Ftiziologia, **VII**, *3*, 209 (1958).
10. L. P. WEISS, D. W. FAWCETT, *Cytochemical observations on chicken monocytes, macrophages and giant cells in tissue culture*, J. Histochem. Cytochem., *1*, 47 (1953).
11. EUG. PĂUNESCU, *Acţiunea hidrazidei acidului izonicotinic asupra activităţii reducătoare a celulei bacteriene*, St. cerc. biochimie, **IV**, *4*, 543 (1961).
12. P. GEORGESCU, EUG. PĂUNESCU, *Metode biochimice de diagnostic şi cercetare*, Bucureşti, Edit. medicală, 1960.
13. J. ROCHE, *Phosphatases*, în *The Enzymes*, vol. I, part. 1, New York, Academic Press Inc., 1950.
14. J. AXELROD, *The enzymatic deamination of amphetamine*, J. Biol. Chem., **214**, 753 (1955).
15. A. C. ALLISON, *Genetic factors in resistance to malaria*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **91**, 413 (1961).
16. A. J. DAY, *Oxidation of ^{14}C-labeled chylomicron fat and ^{14}C-labeled unesterified fatty acids by macrophages in vitro and the effect of clearing factors*, Quart. J. exp. Physiol., **45**, 220 (1960).
17. R. J. HAVEL, D. S. FREDRICKSON, *Removal of palmitic acid-1-^{14}C-labeled chylomicron from dog plasma*, J. Clin. Invest., **35**, 1 025 (1956).
18. E. SUTER, L. HULLIGER, *Nonspecific and specific cellular resistance to infection*, Ann. N. Y. Acad. Sci., **88**, 1 237 (1960).
19. J. G. HOWARD, *Activation of the reticuloendothelial cells of the mouse liver by bacterial lipopolysaccharide*, J. Pathol. Bact., **78**, 465 (1959).
20. R. COSTELLO, R. J. DUBOS, R. W. SCHAEDLER, *Measurement of resistance to experimental tuberculosis in mice*, J. Exp. Med., **116**, *6*, 847 (1962).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 237–242, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

EXOSMOZA FOSFATULUI ANORGANIC ÎN DIFERITE STĂRI FUNCȚIONALE ALE MUȘCHIULUI

DE

TRAIAN RĂDULESCU și LORA SCOLNIC

Rezumat. — S-a constatat că paralelismul dintre conținutul în fosfat anorganic din mușchiul gastrocnemian de broască *in situ* și viteza exosmozei lui are un caracter general, indiferent de starea funcțională a mușchiului. Astfel, în denervare, ca și în curarizare — stări care se caracterizează printr-o creștere a nivelului fosfocreatinei, respectiv scăderea fosfatului anorganic —, s-a pus în evidență o micșorare a difuziei fosfatului. Este de remarcat că, în denervare, sinteza fosfocreatinei este un proces extrem de rapid. De asemenea distrugerea măduvei spinării, ca și excitarea electrică — caracterizate printr-o scindare a fosfocreatinei, respectiv o creștere a nivelului fosfatului anorganic din mușchi —, sînt însoțite de o mărire a acestei difuzii.

Autorii au arătat că distrugerea măduvei spinării determină modificări reversibile, comparabile cu cele produse de un curent electric slab și cu timp de acțiune scurt.

Într-o lucrare anterioară [1] am arătat că scăderea fosfatului anorganic în mușchiul curarizat, datorită participării sale directe sau indirecte la sinteza fosfocreatinei, este însoțită de o micșorare a difuziei fosfatului într-o soluție salină. De asemenea, în procesul contracției musculare — cu sau fără travaliu extern — creșterea nivelului fosfatului anorganic, corespunzătoare scindării fosfocreatinei, duce la o mărire a acestei difuzii. Se constată deci un paralelism între conținutul și viteza exosmozei fosfatului anorganic din mușchi. Dacă acest fenomen, pus în evidență în curarizare și contracție musculară, ar avea un caracter general, el ar trebui să apară și în alte stări funcționale, cum ar fi, de exemplu, cele produse în urma denervării mușchilor sau a distrugerii măduvei spinării. Aceasta este cu atît mai probabil, cu cît și A. Palladin și R. Sigalova [2] au arătat că nivelul fosfocreatinei din mușchi este determinat de echilibrul dinamic dintre procesele de scindare, produse de excitațiile pornite de la sistemul nervos central, și procesele de sinteză. După acești autori, denervarea suprimă transmisia excitațiilor emise de sistemul nervos central și anulează procesele de scindare, producînd astfel creșterea nivelului fosfo-

creatinei, fapt constatat și de T. Amako și colab. [3]. Este de menționat că autorii citați au urmărit efectul denervării după minimum 24 de ore de la intervenție.

Dacă fosfatul anorganic ia parte la sinteza fosfocreatinei, ne putem aștepta la o scădere a conținutului său în mușchi, ceea ce ar putea determina o micșorare corespunzătoare a vitezei de exosmoză. În ceea ce privește distrugerea măduvei spinării, E. Macovschi și C. Iordache [4] au arătat că ea produce, ca și excitarea electrică, o scindare a fosfocreatinei însoțită de o creștere a fosfatului anorganic liber din mușchi. Este deci probabil ca și în acest caz, conform paralelismului—stabilit anterior [1]—dintre conținutul în fosfat și viteza exosmozei lui, să apară o creștere a fosfatului anorganic difuzat.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe mușchiul gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*), *in situ*. Experiențele s-au efectuat pe broaște ținute 24 de ore la temperatura laboratorului și apoi fixate, cu 15 min înainte de experiență, pe o placă.

Denervarea mușchiului s-a obținut prin secționarea nervului sciatic de la unul dintre picioarele posterioare, celălalt picior servind ca martor. Distrugerea măduvei spinării s-a făcut în mod obișnuit. Experiențele s-au efectuat pe loturi de 10 broaște cu măduva spinării distrusă, în comparație cu loturi de 10 broaște normale. Determinarea fosfatului anorganic liber s-a făcut după procedeul K. Lohmann [5], folosind metoda de dozare C. H. Fiske și Y. Subbarow [5], iar a fosfatului difuzat, în condițiile stabilite într-o altă lucrare [7].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Interpretarea datelor obținute pe mușchii gastrocnemieni simetrici ai aceluiași animal de experiență a fost posibilă datorită faptului, constatat anterior, al concordanței atît a conținutului în fosfat anorganic cît și în fosfat anorganic difuzat din mușchii simetrici [7]. Efectul denervării unuia dintre mușchi asupra conținutului în fosfat anorganic și asupra exosmozei lui a fost urmărit la diferite intervale de timp : imediat după denervare, apoi la 2 și 24 de ore după denervare, adică după intervale de timp mult mai mici decît în cazul experiențelor altor autori [2], [3].

Din datele obținute [tabela nr. 1] rezultă că pentru toate variantele amintite avem o scădere a conținutului în fosfat anorganic. Aceste rezultate confirmă deci creșterea nivelului fosfocreatinei, observată de alți autori [2], [3] după 24 de ore sau mai mult de la denervare. Comportarea asemănătoare constatată după 2 ore sau chiar imediat după denervare

dovedește că deplasarea echilibrului în sensul sintezei de fosfocreatină nu necesită un interval anumit de timp, ci se face instantaneu. Scăderea conținutului în fosfat anorganic din mușchiul denervat este însoțită de

Tabela nr. 1

Fosfatul anorganic liber și fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină, din mușchii gastrocnemieni de broască, unul din mușchi fiind denervat, iar celălalt, simetric, normal

Mușchi denervat = D Mușchi normal = N

Fosfat anorganic liber în γ P/g mușchi		Fosfat anorganic difuzat în sol. salină în γ P/mușchi		Greutatea mușchilor supuși exosmozei	
N	D	N	D	N	D
I. *Picioarele tăiate imediat după denervarea mușchiului*					
456	265	36	22,00	0,40	0,40
500	379	41	14,50	0,50	0,55
532	372	95	62,00	1,00	0,90
687	574	113	91,00	0,80	0,80
418	300	23	15,00	0,50	0,50
II. *Picioarele tăiate la 2 ore după denervarea mușchiului*					
1 034	717	18,5	9	1,00	1,00
1 128	813	23,0	13	0,60	0,60
889	787	75,0	46	0,70	0,75
—	—	12,5	6	0,70	0,70
—	—	38,0	25	0,75	0,75
III. *Picioarele tăiate la 24 de ore după denervarea mușchiului*					
748	496	38,5	12,0	0,50	0,45
772	636	30,5	14,0	0,75	0,80
760	584	31,0	24,0	0,70	0,65
544	400	20,5	11,5	1,00	0,95
720	520	37,0	13,0	1,05	1,00

o scădere corespunzătoare a fosfatului difuzat; astfel se confirmă paralelismul dintre nivelul fosfatului anorganic și viteza exosmozei lui, fapt constatat și în cazul mușchiului curarizat [1].

Efectul distrugerii măduvei spinării, comparabil cu acela al unei excitări electrice [4], s-a urmărit în două variante și anume: în prima variantă tăierea picioarelor s-a făcut imediat după intervenție, iar în a doua variantă după 3 min.

S-au ales aceste două variante ținînd seama că într-o lucrare anterioară [7] s-a arătat că sub acțiunea curenților electrici puternici se produce o modificare persistentă a permeabilității mușchiului, în timp ce sub acțiunea curenților electrici mai slabi această modificare este reversibilă.

În cazul cînd excitarea produsă de distrugerea măduvei spinării este similară cu acțiunea unui curent electric puternic, ea va condiționa perturbări durabile în desfășurarea proceselor biochimice musculare; în cazul cînd această excitare ar corespunde acțiunii unui curent electric slab, nu se vor mai produce perturbări ale acestui biochimism, acesta putînd fi surprins dacă tăierea picioarelor se face imediat după distrugerea măduvei spinării.

Din datele prezentate în tabela nr. 2, corespunzătoare primei variante, rezultă că nivelul fosfatului anorganic din mușchii lotului de broaște cu măduva spinării distrusă este mai mare decît la mușchii din lotul de broaște normale. De asemenea cantitatea de fosfat anorganic difuzat din mușchii primului lot este mai mare decît la lotul normal.

Tabela nr. 2

Fosfatul anorganic liber și fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină, din mușchiul gastrocnemian de broască normală față de broasca cu măduva spinării distrusă. Tăierea picioarelor s-a făcut imediat după operație

Broască normală = N Broască cu măduva spinării distrusă = S

Fosfat anorganic liber în γ P/g mușchi		Fosfat anorganic difuzat în soluție salină în γ P/mușchi	
N	S	N	S
355	468	19,0	31,5
360	394	6,3	17,2
294	372	5,5	60,0
246	338	20,5	31,0
242	390	20,3	13,2
368	360	10,7	12,0
276	405	15,7	23,0
387	532	13,0	32,5
302	300	7,5	34,0
242	437	15,7	23,5
Media 307,2	399,6	13,42	27,79

D exp. = 92,40
$F_{0.05} = 4,41$
$F_{0.01} = 8,28$
F exp. = 11,23
$D_{0.05} = 35$

D exp. = 14,37
F exp. = 80
$D_{0.05} = 12,11$

În cazul celei de-a doua variante (tabela nr. 3) nu apar diferențe semnificative între lotul cu măduva distrusă și lotul normal, nici în ce privește valoarea fosfatului anorganic liber din mușchi, nici în ce privește valoarea celui difuzat. Aceste rezultate indică faptul că efectul provocat de distrugerea măduvei spinării este similar cu acela al unui curent electric slab, deoarece, ca și acesta, el determină modificări reversibile.

Rezultatele obținute în condiții de distrugere a măduvei spinării confirmă și de data aceasta, pentru ambele variante, paralelismul dintre conținutul în fosfat anorganic liber și viteza exosmozei acestuia.

Tabela nr. 3

Fosfatul anorganic liber și fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină, din mușchiul gastrocnemian de broască normală față de broasca cu măduva spinării distrusă. Tăierea picioarelor s-a făcut la 3 min după operație

Broască normală = N Broască cu măduva spinării distrusă = S

Fosfat anorganic liber în γ P/g mușchi		Fosfat anorganic difuzat în soluție salină în γ P/mușchi	
N	S	N	S
263	315	19,0	17,5
329	419	6,3	33,2
198	233	5,5	8,5
301	272	20,5	40,0
268	265	20,3	15,5
272	265	10,7	31,0
272	276	15,7	8,0
267	294	13,0	17,7
302	312	7,5	8,7
242	292	15,7	10,7
Media 271,4	294,3	13,42	19,08

$F_{0,05} = 4,41$
$F_{0,01} = 8,28$
F exp. = 1,38

F exp. = 1,91

CONCLUZII

Cercetări efectuate pe mușchiul gastrocnemian de broască *in situ*, în condiții de denervare, respectiv de distrugere a măduvei spinării, au pus în evidență existența unui paralelism între conținutul în fosfat anorganic liber din mușchi și cantitatea de fosfat difuzat. Aceste rezultate, împreună cu cele corespunzătoare obținute prin curarizare și contracție musculară, dovedesc că fenomenul observat are un caracter mult mai general.

Comparînd nivelele fosfatului anorganic liber găsite la anumite intervale de timp de la denervarea mușchiului, s-a stabilit că, spre deosebire de ceea ce indică literatura, sinteza fosfocreatinei se face rapid și nu necesită o perioadă mai lungă.

Distrugerea măduvei spinării este comparabilă cu acțiunea unui curent electric slab, determinînd, ca și acesta, modificări reversibile.

Prezentată la redacție
la 25 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. T. RĂDULESCU, D. COTARIU, L. SCOLNIC, *Fosforul anorganic şi exosmoza lui din muşchi, în diferite stări de excitabilitate şi efort*, St. cerc. biochimie, **VII**, *1*, 97 (1964).
2. A. V. PALLADIN, R. SIGALOVA, *Contribution à l'étude de la biochimie de l'acide créatine-phosphorique. L'influence de la section du nerf sur le taux de l'acide créatine-phosphorique dans le muscle*, Bull. Soc. Chim. Biol., *15*, 1263 (1933).
3. T. AMAKO, J. KOGA, S. NAKAYAMA, Y. MORISHIMA, S. YOSHINAGA, *Biochemical studies on paralysed muscles*, C. A. *54*, 21 396 e (1960).
4. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcţionale ale muşchiului*, St. cerc. biochimie, **V**, *2*, 207 (1962).
5. K. LOHMANN, *Über die Isolierung verschiedener natürlichen Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit*, Biochem. Z., *194*, 306 (1928).
6. C. H. FISKE, Y. SUBBAROW, *The colorimetric determination of phosphorus*, J. Biol. Chem., *66*, 375 (1925).
7. E. MACOVSCHI, T. RĂDULESCU, L. SCOLNIC, *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării muşchiului*, St. cerc. biochimie, **V**, *4*, 485 (1962).

ST. CERC. BIOCHIMIE TOMUL, 7 NR. 2, P. 243–248 BUCUREȘTI, IUNIE 1964

EXOSMOZA FOSFATULUI ANORGANIC DIN MUȘCHI ÎN NARCOZĂ ȘI MIȘCARE PASIVĂ

DE

TRAIAN RĂDULESCU și DITA COTARIU

Rezumat. — Alături de acțiunea de întrerupere a influenței sistemului nervos, novocaina exercită și o acțiune de creștere a permeabilității țesutului muscular. Aceste două acțiuni conduc la nivelarea cantităților de fosfat anorganic difuzat din mușchiul narcotizat și normal. Datorită diminuării în timp a acțiunii narcoticului, scade influența lui asupra permeabilității, cantitatea de fosfat anorganic difuzat fiind determinată doar de nivelul fosfatului anorganic liber din mușchi. În aceste condiții, s-a pus în evidență paralelismul dintre cantitatea de fosfat anorganic liber din mușchi și viteza exosmozei acestuia. Acest paralelism se manifestă și în cazul mișcării pasive.

Literatura menționează că anularea parțială sau totală a influenței sistemului nervos, produsă prin curarizarea [1], [2] sau denervarea [3], [4] mușchilor, are ca rezultat o creștere a nivelului fosfocreatinei.

Cercetările noastre anterioare au arătat [5], [6], în concordanță cu aceste date, că în curarizare și denervare sinteza fosfocreatinei se face, direct sau indirect, pe seama fosfatului anorganic liber din mușchi. De asemenea s-a arătat că între cantitatea de fosfat anorganic liber din mușchi și viteza exosmozei acestuia există un paralelism. De aceea este de așteptat ca narcoza, care anulează și ea acțiunea sistemului nervos asupra mușchilor, să producă modificări asemănătoare.

Într-adevăr, E. Macovschi și C. Iordache [7] au pus în evidență o scădere apreciabilă a fosfatului anorganic în mușchii animalelor narcotizate, deși, fapt surprinzător, nu constată o creștere corespunzătoare a nivelului fosfocreatinei. În schimb, în mișcarea pasivă a mușchilor, considerată de acești autori [7] ca similară curarizării, denervării și narcotizării, se relevă o scădere a cantității de fosfat anorganic liber, însoțită de o creștere corespunzătoare a nivelului fosfocreatinei.

Aceste constatări ne-au determinat să cercetăm dacă paralelismul dintre conținutul în fosfat anorganic și viteza exosmozei lui, valabil pentru curarizare și denervare, mai poate fi pus în evidență și în cazul narcozei și al mișcării pasive.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate pe mușchi gastrocnemian de broască (*Rana ridibunda*) *in situ*, în condițiile stabilite anterior [5].

Narcoza s-a obținut injectînd în sacul dorsal 1 ml soluție apoasă de clorhidrat de novocainã 0,5%. Picioarele erau tăiate simultan după 15 min, respectiv 60 min de la injectare, cînd relaxarea era totală. Mișcarea pasivă s-a executat timp de 15 min, numai la unul dintre picioarele posterioare, în condițiile stabilite de E. Macovschi și C. Iordache [7]; celălalt picior a servit ca martor. Fosfatul anorganic liber din mușchi s-a determinat după procedeul K. Lohmann [8], folosind metoda de dozare C. H. Fiske și Y. Subbarow [9], iar fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină, în decurs de 2 ore, s-a determinat în condițiile stabilite într-o altă lucrare [10].

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Pornind de la constatarea anterioară [5] privind concordanța dintre cantitatea de fosfat anorganic și viteza exosmozei sale pentru mușchii gastrocnemieni ai broaștei normale, era necesar să se stabilească dacă aceasta se menține și pentru mușchii broaștei narcotizate. Din tabela nr. 1 rezultă că avem în ambele cazuri o concordanță satisfăcătoare. Pentru a putea urmări, pe același animal, influența exercitată de narcotic, s-a utilizat un procedeu folosit într-o lucrare anterioară [5], și anume legarea unuia dintre picioarele posterioare ale animalului deasupra mușchiului gastrocnemian; astfel se împiedică pătrunderea narcoticului în mușchiul piciorului legat. Pentru a verifica dacă legarea însăși nu are vreo influență asupra nivelului fosfatului anorganic sau asupra exosmozei sale, s-au efectuat cîteva experiențe în acest scop. Din tabela nr. 2 se observă o concordanță satisfăcătoare între piciorul legat și cel liber, atît pentru fosfatul anorganic liber cît și pentru cel difuzat.

Odată aceste condiții de lucru stabilite, s-a trecut la efectuarea experiențelor de narcoză. Durata de 15 min de la injectarea novocainei pînă la tăierea simultană a picioarelor a fost suficientă pentru relaxarea totală a broaștei. Din rezultatele obținute (tabela nr. 3, I a) reiese că conținutul în fosfat anorganic liber în mușchiul narcotizat este mult mai mic decît cel din mușchiul normal, așa cum au arătat de altfel și E. Macovschi și C. Iordache [7] în cazul narcozei cu eter.

În schimb, spre deosebire de curarizare și denervare, cantitatea de fosfat anorganic difuzat din mușchiul narcotizat este practic egală cu cea difuzată din mușchiul normal (tabela nr. 3, I b). Această comportare neașteptată a mușchiului s-ar putea explica dacă admitem că în cazul narcozei intervin și alți factori capabili să influențeze exosmoza fosfa-

tului anorganic liber din mușchi. Se știe din literatură [11], [12] că narcoticele măresc permeabilitatea țesuturilor. Este deci foarte probabil că novocaina, alături de acțiunea de întrerupere a influenței sistemului nervos care produce o scădere a conținutului în fosfat anorganic, deter-

Tabela nr. 1

Fosfatul anorganic liber și fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină 0,7 %, din mușchii gastrocnemieni simetrici de broască narcotizată cu novocaină

Mușchiul stîng = S ; mușchiul drept = D

Fosfat anorganic liber (în γ P/g mușchi)		Fosfat anorganic difuzat în soluție salină (în γ P/mușchi)		Greutatea mușchilor supuși exosmozei (în g)	
S	D	S	D	S	D
409	395	44	50	0,80	0,80
422	373	12	10	0,70	0,65
518	533	8	10	0,65	0,70
653	654	10	9	0,50	0,50
377	367	—	—	—	—

Tabela nr. 2

Fosfatul anorganic liber și fosfatul anorganic difuzat într-o soluție salină 0,7 %, din mușchii gastrocnemieni simetrici de broască. Un picior este legat timp de 60 min

Mușchiul stîng = S ; (picior legat) mușchiul drept = D (martor)

Fosfat anorganic liber (în γ P/g mușchi)		Fosfat anorganic difuzat în soluție salină (în γ P/mușchi)		Greutatea mușchilor supuși exosmozei (în g)	
S	D	S	D	S	D
460	403	11,0	10,0	0,15	0,15
496	461	10,0	9,0	0,75	0,80
629	691	9,0	8,0	0,85	0,90
666	646	12,5	12,5	0,85	0,85
581	555	15,0	20,0	0,75	0,75

mină și o creștere a permeabilității mușchiului, care are ca rezultat mărirea cantității de fosfat difuzat. Manifestarea concomitentă a acestor două efecte explică nivelarea valorilor de fosfat anorganic difuzat din mușchiul narcotizat și din cel simetric normal.

Deoarece în condițiile noastre de lucru, după 90 min de la injectarea narcoticului, animalul de experiență își revenea total din narcoză, nu era exclus ca după un interval de timp mai mare decît cel din experiențele noastre (15 min) să se producă unele schimbări în intensitatea fenomenului semnalat, urmate de unele modificări ale permeabilității mușchiului. De aceea s-a ținut seama ca intervalul de timp ales să nu depășească durata de acțiune a narcoticului. În această serie de experiențe, tăierea picioarelor

s-a efectuat după 60 min de la injectare. Din tabela nr. 3, II a şi II b, se vede că conţinutul de fosfat anorganic liber din muşchiul narcotizat este mai mic decît cel din muşchiul simetric normal, dovadă că muşchiul se găseşte încă sub acţiunea narcoticului.

Tabela nr. 3

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină 0,7%, din muşchii gastrocnemieni de broască *in situ*. Un muşchi este sub acţiunea novocainei; muşchiul simetric legat, normal

I = durata narcozei, 15 min;
II = „ „ 60 min.
Muşchi normal = N; muşchi sub acţiunea novocainei = n

Fosfat anorganic liber (în γ P/g muşchi)				Fosfat anorganic difuzat în soluţie salină (în γ P/muşchi)			
I a		IIa		Ib		IIb	
N	n	N	n	N	n	N	n
802	455	559	602	13,5	18,5	37,0	16
595	500	569	594	6,0	6,0	17,0	17
634	510	464	433	14,5	13,5	36,0	20
817	694	564	513	18,0	14,0	21,5	21
638	481	957	485	12,5	9,0	68,0	26
763	612	628	498	9,0	7,5	43,0	11
592	456	571	523	41,0	58,0	32,0	19
736	528	621	492	22,5	27,0	56,0	26
Media 697	529	616	518	17,0	19,0	38,8	19,5
D = 168		D = 98		D = 2		D = 19,3	

Tabela nr. 4

Fosfatul anorganic liber şi fosfatul anorganic difuzat într-o soluţie salină 0,7%, din muşchii gastrocnemieni de broască. Un muşchi este supus 15 min mişcării pasive, muşchiul simetric în repaus

Muşchi în repaus = R; muşchi supus mişcării pasive = P

Fosfat anorganic liber în γ P/g muşchi		Fosfat anorganic difuzat în soluţie salină în γ P/muşchi	
R	P	R	P
572	449	44	32,5
1 076	800	46	37,0
702	595	24	21,0
801	598	73	28,0
786	526	77	68,0
683	581	56	33,5
830	566	23	12,0
504	448	20	12,0
Media 744	570,3	45,3	30,5

În ceea ce priveşte cantitatea de fosfat anorganic difuzat din muşchiul narcotizat, se constată de astă dată o scădere faţă de muşchiul simetric normal, întocmai ca în curarizare şi denervare. Aceasta denotă că narcoticul îşi manifestă şi după 60 min acţiunea sa de scădere a cantităţii de fosfat anorganic liber, deşi în măsură mai mică (tabela nr. 3, II a), dar nu mai influenţează permeabilitatea muşchiului. În aceste condiţii noi de lucru, s-a dovedit că viteza exosmozei fosfatului anorganic este determinată doar de cantitatea de fosfat anorganic liber din muşchi, conform paralelismului dintre aceste valori, stabilit anterior [5], [6].

Datele experimentale obținute în mișcarea pasivă a mușchiului arată o scădere atît a cantității de fosfat anorganic liber cît și a celei de fosfat anorganic difuzat (tabela nr. 4).

Se constată că paralelismul dintre conținutul mușchiului în fosfat anorganic liber și viteza exosmozei acestuia, pus în evidență în curarizare, denervare și în unele condiții de narcotizare, se menține și în cazul mișcării pasive.

Prezentată la redacție
la 25 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. G. Martino, *Curarization and phosphagen contents of striated muscles*, Chem. Abstr., **22**, 2 621 (1928).
2. T. Masayama, *The effect of severing the nerve paths upon the chemical changes induced in muscles by toxins which stimulate the sympathetic system*, Chem. Abstr., **26**, 2 508 (1932).
3. A. Palladin, R. Sigalova, *Contribution à l'étude de la biochimie de l'acide créatine-phosphorique. L'influence de la section du nerf sur le taux de l'acide créatine-phosphorique dans le muscle*, Bull. Soc. Chim. Biol., **15**, 1 263 (1933).
4. T. Amako, I. Koga, S. Nakayama, Y. Morishima, S. Yoshinaga, *Biochemical studies on paralysed muscles*, Chem. Abstr., **54**, 21 396 (1960).
5. T. Rădulescu, D. Cotariu, L. Scolnic, *Fosforul anorganic și exosmoza lui din mușchi în diferite stări de excitabilitate și efort*, St. cerc. biochimie, **VII**, *1*, 97 (1964).
6. T. Rădulescu, L. Scolnic, *Exosmoza fosfatului anorganic în diferite stări funcționale ale mușchiului*, acest volum, p. 237.
7. E. Macovschi, C. Iordache, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului*, St. cerc. biochimie, **IV**, 2, 207 (1962).
8. K. Lohmann, *Über die Isolierung verschiedenen natürlichen Phosphorsäureverbindungen und die Frage ihrer Einheitlichkeit*, Biochem. Z., **194**, 306 (1928).
9. C. H. Fiske, Y. Subbarow, *The colorimetric determination of phosphorus*, J. Biol. Chem., **66**, 375 (1925).
10. E. Macovschi, T. Rădulescu, L. Scolnic, *Exosmoza fosforului anorganic ca test al stării mușchiului*, St. cerc. biochimie, **V**, *4*, 485 (1962).
11. J. Régnier, R. David, P. Vertadier, *Tensions interfaciales à la surface de séparation eau-huile d'olive de solutions aqueuses de divers sels de paraminobenzoyldiéthylaminoéthanol*, C. R. Soc. Biol., **137**, 680 (1943).
12. E. Macovschi, D. Cotariu, *Acțiunea clorhidratului de novocaină asupra permeabilității membranei branhiale vii de Cyprinus carpio pentru saponină*. Com. Acad. R.P.R., **VII**, *1*, 31 (1957).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 249–256, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

CUPLAREA CLORURII DE *1*-DIMETILAMINO-NAFTALIN-*5*-SULFONIL CU PROTEINELE SERICE ȘI PURIFICAREA CONJUGATELOR OBȚINUTE

DE

H. D. SCHELL și V. GHEȚIE

Rezumat. — Pe baza datelor din literatură, s-a preparat clorura de *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonil sub formă cristalină.

Fluorocromarea proteinelor serice *in vitro* și *in vivo* a dovedit existența unei competiții între diferitele fracțiuni ale proteinelor serice pentru fluorocrom. Competiția variază de la specie la specie, albumina captînd însă întotdeauna cea mai mare cantitate de clorură de DANSIL. De aceea se recomandă pentru marcarea anticorpilor folosirea preparatelor purificate de anticorpi (γ-globuline) și nu antiseruri integrale.

Dintre metodele folosite pentru purificarea conjugatelor fluorescente de substanțe de balast, cromatografia pe DEAE-celuloză s-a dovedit a fi cea mai eficientă.

Substanțele fluorescente întrebuințate la marcarea anticorpilor posedă o grupare funcțională prin intermediul căreia se fixează pe molecula proteică, fără a-i altera specificitatea sau activitatea biologică. Din numărul mare de fluorocromi propuși pentru cuplare cu anticorpi, pe lîngă izocianatul de fluoresceină [1] și izotiocianatul de fluoresceină [2] se folosește în prezent tot mai mult și clorura de *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonil (clorura de DANSIL), deși are o intensitate de trei ori mai mică decît a fluoresceinei, deoarece, spre deosebire de izocianiții sau izotiocianații de fluoresceină, permite introducerea mai multor grupări fluorescente pe molecula de proteină [3] și se fixează de aceasta printr-o legătură sulfonamidică mai stabilă decît cea carbamidică sau tiocarbamidică a derivaților fluoresceinei. Totodată, legătura sulfonamidică este mai puțin susceptibilă de a fi desfăcută de enzimele tisulare [4], proprietate care poate fi utilă în experiențe ce urmăresc soarta antigenelor marcate în organism.

De aceea am considerat oportună folosirea clorurii de DANSIL în experiențele noastre care urmăresc hidroliza cateptică *in vitro* și *in vivo* a antigenelor marcate. În acest scop era necesar să clarificăm, prin experiențe prealabile, unele detalii ale preparării și purificării conjugatelor

de DANSIL, insuficient precizate sau contradictoriu prezentate în literatura de specialitate. Obiectivele cercetării noastre au fost :

1. Prepararea în stare cristalină a fluorocromului.

2. Cuplarea clorurii de DANSIL cu proteinele serice în condiţiile folosirii serului integral sau a fracţiunilor globulinice separate în prealabil.

3. Cercetarea eficienţei procedeelor de purificare aplicate curent la conjugatele fluorescente.

4. Fluorocromarea proteinelor serice *in vivo* prin injectarea directă a clorurii de DANSIL în animalele de experienţă.

Cel de-al doilea obiectiv se impunea datorită faptului că în prezent unii autori folosesc la cuplarea anticorpilor cu fluoresceină antiserurile integrale, iar alţii preparate purificate care conţin practic numai anticorpii. După părerea noastră, folosirea antiserurilor integrale este mai comodă experimental, deoarece implică o singură etapă de purificare, în care se îndepărtează atît fluorocromul nereacţionat, cît şi proteinele imunologic inactive cuplate cu substanţa fluorescentă. A doua soluţie prezintă în schimb un avantaj prin faptul că în mediul de reacţie nu există decît cei doi parteneri interesaţi în reacţie, fluorocromul şi anticorpii. Cînd fluorocromul se adaugă la antiserul integral poate exista, în principiu, şi o competiţie pentru colorant între anticorpi şi celelalte fracţiuni proteice, care determină o marcare mai slabă a anticorpilor. Experienţele lui J. L. Riggs şi colab. [5] par să indice însă că o astfel de competiţie nu are loc, dar datele fiind obţinute cu izotiocianatul de fluoresceină nu pot fi extinse fără verificare experimentală şi asupra clorurii de DANSIL. Aceasta cu atît mai mult, cu cît în literatura de specialitate există indicii că la folosirea clorurii de DANSIL o astfel de competiţie ar putea avea loc [6].

1. SINTEZA FLUOROCROMULUI

a) *Prepararea acidului* 1-*dimetilamino-naftalin*-5-*sulfonic*. Am folosit la sinteză acidul *1*-amino-naftalin-*5*-sulfonic tehnic, de culoare cenuşie-violetă, care în scopul purificării a fost recristalizat de cîteva ori din soluţie apoasă fierbinte, slab alcalină, prin acidulare cu HCl diluat şi răcire. Produsul recristalizat (foiţe violacee strălucitoare) a fost apoi metilat. Dintre metodele de metilare indicate în literatură şi încercate de noi, nu ne-au dat satisfacţie nici aceea care foloseşte ca agent de metilare CH_3I [7], nici aceea care foloseşte metilarea la rece cu $(CH_3)_2SO_4$ [8]. Ne-am oprit asupra unei metode care foloseşte tot $(CH_3)_2SO_4$, dar în următoarele condiţii de lucru [9] :

Într-un balon cu fund rotund, prevăzut cu un refrigerent ascendent şi o pîlnie picătoare, se introduc 20 g acid *1*-amino-naftalin-*5*-sulfonic, împreună cu o soluţie de 20 g NaOH în 120 ml apă distilată. Peste terciul din balonul de reacţie, adus la fierbere, se adaugă prin pîlnia de picurare 45 ml $(CH_3)_2SO_4$ cu o viteză de 1—2 picături pe secundă, menţinînd amestecul de reacţie în fierbere uşoară. După ce toată cantitatea de $(CH_3)_2SO_4$ a fost adăugată, uneori noul acid format poate precipita ; el este adus în soluţie printr-un adaos de puţin NaOH 40% şi o scurtă fierbere. Apoi se răceşte amestecul, se acidulează cu HCl 5 N şi se

filtrează la trompă. Noul acid format se recristalizează din HCl 0,1 N fierbinte sau numai din apă și se prezintă sub formă de foițe strălucitoare roz-violacee. Randament 80%.

b) *Prepararea clorurii de 1-dimetilamino-naftalin-5-sulfonil.* Clorura de DANSIL a fost preparată în felul următor, ținînd seama în parte și de unele indicații din literatură [8], [9]:

2,1 g acid *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonic se mojarează împreună cu 3,5 g PCl_5 într-un mojar de porțelan încălzit moderat în prealabil. Prin mojarare, amestecul începe să reacționeze, formîndu-se o topitură galbenă-brună. După terminarea reacției, se toarnă deasupra topiturii apă răcită și se trece totul într-o pîlnie de separare. Se extrage de 2—3 ori cu eter dietilic în care clorura se solvă, formînd o soluție galbenă aurie. Extractul eteric se spală de cîteva ori cu apă, se usucă cu $CaCl_2$ și se îndepărtează eterul. Reziduul obținut, introdus într-un exsicator cu vid, peste $CaCl_2$ sau P_2O_5, se prinde de obicei pînă a doua zi într-o masă cristalină (prisme). În ultraviolet, soluția acetonică de clorură de DANSIL emite o fluorescență galbenă, cu un maxim în jur de 520 mμ, net diferită de fluorescența albastră a acidului *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonic.

c) *Păstrarea fluorocromului.* Pentru a păstra clorura un timp cît mai îndelungat, ea a fost adsorbită pe celită (Hyflo Supercel), folosind raportul de 1 parte clorură dizolvată în minimum de acetonă la 10 părți celită [10], [11]. Îndepărtînd apoi acetona cu ajutorul unui suflător, la temperatura camerei, se obține o pulbere galbenă, care a fost folosită în experiențele noastre. Adsorbită pe celită, clorura de DANSIL poate fi păstrată în exsicator luni de zile, la temperatura camerei.

2. COMPETIȚIA PROTEINELOR SERICE PENTRU FLUOROCROM

Pentru a urmări competiția fracțiunilor proteice din ser pentru clorura de DANSIL, s-a efectuat conjugarea folosindu-se ser integral. Gradul conjugării s-a măsurat comparînd fluorescența fracțiunilor proteice separate electroforetic.

Separarea electroforetică s-a efectuat în tampon veronal-veronal sodic pH 8,6, $\mu = 0{,}05$, pe hîrtie Whatman nr. 1, la temperatura camerei, cu 8,5 V/cm și 0,3 mA/cm. După electroforeză, benzile de hîrtie au fost examinate în ultraviolet, pentru însemnarea spoturilor fluorescente și notarea intensității lor relative, după care au fost colorate cu albastru de bromfenol, conform tehnicilor uzuale.

Conjugarea a fost realizată astfel: într-o eprubetă de centrifugă s-a introdus 0,5 ml ser sanguin, care s-a diluat cu 1,0 ml tampon Na_2CO_3—$NaHCO_3$ 0,1 M, pH 9,5. Peste acest amestec s-au adăugat, sub agitare, între 8 și 15 mg celită (conținînd 0,8—1,5 mg fluorocrom). Cu toate că fluorocromarea se petrece instantaneu, amestecul a fost agitat încă 30 de minute la temperatura camerei, după care a fost centrifugat timp de 10 minute la 4 000—5 000 g. Supernatantul s-a analizat apoi electroforetic. Această modalitate de fluorocromare respectă indicațiile literaturii, care cer adăugarea fluorocromului în raport de 0,02—0,04 mg fluorocrom/1 mg proteină, concentrația proteică a amestecului final oscilînd între 1 și 3g% [7].

Prin examinarea electroforegramelor obținute cu ser sanguin uman, s-a constatat că fluorocromarea s-a produs preferențial, cantitatea cea mai mare de fluorocrom fiind captată de albumină. Dintre globuline, numai fracțiunile α_2 și γ leagă o mică cantitate de fluorocrom (fig. 1, *I*).

Legarea unei cantități mari de fluorocrom de albumină reflectă afinitatea dintre această proteină și clorura de DANSIL și nu este determinată de împrejurarea că albumina este componentul majoritar al serului sanguin uman. Acest lucru l-am dovedit folosind un ser din care s-a eliminat o parte din albumină (70% globuline); restul de albumină continuă să capteze majoritatea fluorocromului.

Afinitatea albuminei pentru fluorocrom nu poate fi micșorată nici prin scăderea pH-ului amestecului de reacție. Atît la pH 8 (tampon borat după Sörensen), cît și la pH 7 (tampon fosfat 0,07 M) albumina intră în competiție pentru fluorocrom, legînd majoritatea acestuia. În plus, la pH 7 γ-globulina nu leagă practic fluorocromul.

Adăugarea fluorocromului în exces pentru saturarea grupărilor reactive ale albuminei (0,2 mg fluorocrom/1 mg proteină) nu îmbunătățește randamentul conjugării globulinelor, ele continuînd să prezinte fluorescență slabă.

În cazul folosirii clorurii de DANSIL, experiențele noastre dovedesc deci existența unei competiții pentru legarea fluorocromului între fracțiunile proteice. De aceea marcarea anticorpilor necesită îndepărtarea completă a albuminei din ser. Mai mult, este recomandabilă și îndepărtarea globulinelor imunologic inactive, deoarece α_2-globulina intră în competiție cu γ-globulina, legînd o bună parte din colorant (fig. 1, *II*). Numai folosirea preparatelor de γ-globuline conduce la marcarea satisfăcătoare a anticorpilor (fig. 1, *III*).

Pentru a vedea în ce măsură sînt valabile observațiile făcute cu ocazia fluorocromării serului sanguin uman și la unele animale situate pe trepte diferite ale scării filogenetice, am extins fluorocromarea și asupra serului sanguin de pește, broască și șobolan. Cu această ocazie, am putut constata, fapt încă nesemnalat în literatură, că proprietatea fracțiunilor proteice ale serului sanguin de a lega fluorocromul variază în funcție de specia animalului cercetat. Astfel, la pește și broască fluorocromarea fracțiunilor este mai puțin selectivă, globulinele legînd și ele cantități importante de clorură de DANSIL (fig. 2, *I* și *II*). Se păstrează însă afinitatea mai mare dintre albumină și fluorocrom, serul de pește avînd cea mai puternică fluorescență în zona albuminei, deși la pește această fracțiune nu depășește 30% din proteinele totale. Rămîne caracteristică pentru pește și broască fluorocromarea tuturor fracțiunilor separate electroforetic. Această comportare nu se păstrează la mamifere, unde numai anumite fracțiuni leagă fluorocromul (fig. 1, *I* și fig. 2, *III*). Este interesant de observat că, spre deosebire de serul sanguin uman, la serul de șobolan se fluorocromează și fracțiunile α_1- și β-globulinice, dispărînd în schimb capacitatea fracțiunii α_2-globulinice de a lega fluorocromul.

Comportarea diferită a fracțiunilor proteice la fluorocromare este, desigur, legată de particularitățile lor structurale, caracteristice speciilor cercetate.

3. FLUOROCROMAREA *IN VIVO*

Introducerea intravenoasă sau pe alte căi a substanțelor proteice marcate cu substanțe fluorescente este o tehnică folosită de numeroși autori pentru rezolvarea unor probleme fără nici o tangență cu imunologia cum ar fi : studiul permeabilității capilare, localizarea unor proteine, enzime, hormoni, studiul unor enteropatii cu pierdere de substanțe proteice, transportul proteic de la mamă la făt etc. [12].

Pornind de la constatarea că conjugarea proteinelor serice cu clorura de DANSIL se poate realiza *in vitro* și în jurul pH-ului 7,0, corespunzător sîngelui, am încercat să realizăm fluorocromarea directă a proteinelor serice, *in vivo*, injectînd la animalele de experiență o cantitate corespunzătoare de substanță fluorescentă.

Deoarece clorura de DANSIL nu este solubilă în apă, ea a fost introdusă în sacul limfatic la broască, sau intraperitoneal la șobolan sub forma unei suspensii în soluție clorurosodică izotonă de fluorocrom prins pe celită sau dizolvat în eter sau acetonă. S-au injectat cîte 10—15 mg fluorocrom pentru broaște și 30—40 mg pentru șobolani. Animalele tolerează foarte bine clorura de DANSIL, iar serul, recoltat după 24 de ore de la injectare, arată că s-a produs fluocromarea *in vivo* a proteinelor serice (fig. 3).

Distribuția fluorescenței pe diferitele fracțiuni proteice este asemănătoare cu cea obținută la fluorocromarea *in vitro*, cu deosebirea că la șobolani nu se mai constată prezența clorurii de DANSIL libere și hidrolizate (acidul *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonic). Absența fluorocromului liber în serul de șobolan arată că absorbția colorantului se face lent, ceea ce permite fixarea sa integrală pe proteinele serice. La broască, fie că absorbția colorantului a fost mai rapidă, fie că s-a injectat o cantitate de fluorocrom care a depășit capacitatea de legare a proteinelor serice.

Experiențele noastre au dovedit că fluorocromarea *in vivo* poate fi aplicată la marcarea proteinelor autologe, deschizîndu-se astfel calea cercetărilor privind transportul acestor proteine.

4. PURIFICAREA CONJUGATELOR FLUORESCENTE PRIN CROMATOGRAFIE PE *DEAE*-CELULOZĂ ȘI FILTRARE PRIN GEL DE SEPHADEX

Purificarea preparatelor brute de anticorpi fluorescenți urmărește îndepărtarea substanțelor de balast care determină absorbția nespecifică, obstacol principal în interpretarea justă a colorațiilor imunofluorescente. Substanțele de balast sînt alcătuite din substanțe fluorescente nereacționate și proteine imunologic inactive care impurifică preparatul de anticorpi supus fluorocromării.

Îndepărtarea substanţelor de balast se realizează prin numeroase procedee, printre care cromatografia pe schimbători de ioni [5], [13], [14] şi filtrarea prin gel [15], [16] ocupă un loc principal.

Noi am încercat purificarea conjugatelor cu clorură de DANSIL folosind ambele metode, în scopul comparării eficienţei lor la îndepărtarea substanţelor de balast.

Au fost supuse conjugării preparate brute de γ-globulină umană, obţinute prin precipitare cu etanol la rece [17]. Electroforetic se constată prezenţa unei singure fracţiuni (fig. 1, *III*).

Filtrarea prin gel s-a făcut la 16°C, folosind o coloană de 15/1,5cm, umplută cu Sephadex G—50; pentru eluţie s-a folosit o soluţie de NaCl 0,15 M. Pentru cromatografie s-a folosit DEAE-celuloză (Whatman DE 50), încărcată într-o coloană de 15/1,5 cm. Eluţia a fost realizată într-o singură etapă, folosindu-se tampon fosfat pH 6,3, 0,02 M.

Atît la filtrarea prin gel de Sephadex cît şi la cromatografia pe DEAE-celuloză cantitatea de proteină introdusă n-a depăşit 100 mg, soluţia proteică fiind echilibrată printr-o dializă de 24 de ore faţă de eluant. Fracţiunile colectate au fost liofilizate.

Analiza imunoelectroforetică s-a efectuat după micrometoda Scheidegger [18], utilizîndu-se tamponul veronal sodic de pH 8,6. Puterea ionică în cuvă a fost de 0,05, iar în plăci de 0,015. S-a folosit un gel de agaroză 1,5% [19]. Potenţialul 18 V/cm, intensitatea 0,8 mA/cm. Durata migrării, 90 min. Imunodifuzia s-a realizat la temperatura camerei, 24 de ore, folosindu-se un ser imun de iepure antiom cu titru ridicat (1/80 000). Prelucrarea plăcilor s-a făcut după metodele curente.

Mersul analizelor s-a urmărit iluminînd coloanele cu o lampă de ultraviolet. S-a observat separarea a două (gel de Sephadex) sau a mai multor (DEAE-celuloză) zone fluorescente care migrează cu viteze diferite spre capătul inferior al coloanei. Atît la Sephadex cît şi la DEAE-celuloză zona fluorescentă care se scurge prima din coloană conţine γ-globuline fluorescente. Zona cu cea mai mică viteză de migrare este alcătuită din clorura de DANSIL liberă, nereacţionată.

Analiza electroforetică şi imunoelectroforetică a preparatelor obţinute prin filtrare pe gel şi cromatografie pe DEAE-celuloză, comparate cu preparatul iniţial de γ-globulină brută fluorescentă, relevă:

1. Atît filtrarea prin gel de Sephadex cît şi cromatografia pe DEAE-celuloză îndepărtează complet materialul fluorescent nereacţionat.

2. Filtrarea prin gel nu îndepărtează proteinele care impurifică preparatul iniţial de γ-globulină. Se constată păstrarea liniilor de precipitare din dreptul β-globulinelor prezente la preparatul iniţial de γ-globulină. Încercînd să înlocuim filtrarea prin gel cu introducerea Sephadex-ului G—25 în stare uscată, direct în preparatul de γ-globulină fluorescentă, aşa cum recomandă Tan King Bien [20] pentru izotiocianatul de fluoresceină, n-am reuşit să îndepărtăm decît o parte din fluorocromul nereacţionat. De aceea filtrarea prin gel rămîne în continuare singurul procedeu de îndepărtare completă a clorurii de DANSIL (fig. 4, *I* şi *II*).

3. Cromatografia pe DEAE-celuloză, efectuată în condiţiile de pH şi putere ionică arătate mai sus, permite atît îndepărtarea fluorocromului nereacţionat cît şi a tuturor proteinelor care impurifică preparatul iniţial.

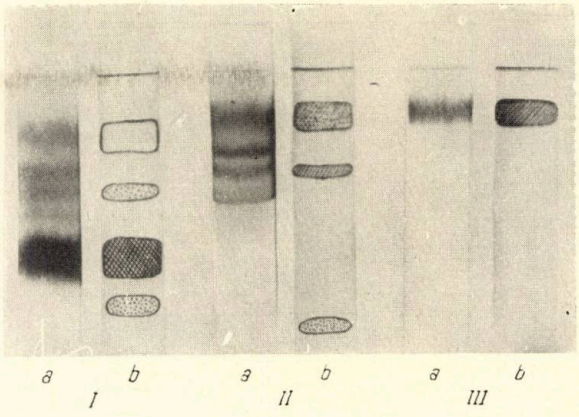


Fig. 1. — Electroforegramele serului integral şi ale globulinelor fluorocromate *in vitro*.

I. Ser uman integral.
II. Globuline.
III. γ-globuline.
a. Proteinogramă; *b*. spoturi fluorescente.

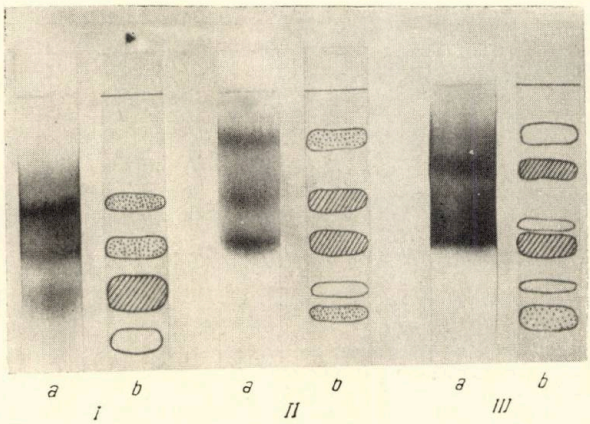
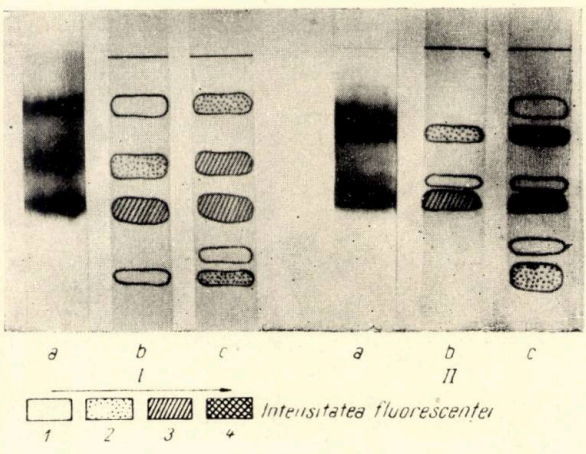


Fig. 2. — Electroforegramele serului sanguin fluorocromat *in vitro* de la unele animale situate pe trepte diferite ale scării filogenetice.

I. Ser de peşte.
II. Ser de broască.
III. Ser de şobolan.
a. Proteinogramă; *b*. spoturi fluorescente.

Fig. 3. — Electroforegramele serului sanguin de broască şi şobolan fluorocromat *in vivo*.

I. Ser de broască.
II. Ser de şobolan.
a. Proteinogramă; *b*. spoturile fluorescente la serul fluorocromat *in vivo*; *c*. spoturile fluorescente la serul fluorocromat *in vitro*.



Spoturile fluorescente nefixate de fracţiunile proteice corespund, în ordinea mărimii vitezei de migrare, la acidul *1*-dimetilamino-naftalin-*5*-sulfonic (fluorescenţă albastră) şi la clorura de DANSIL (fluorescenţă galbenă).

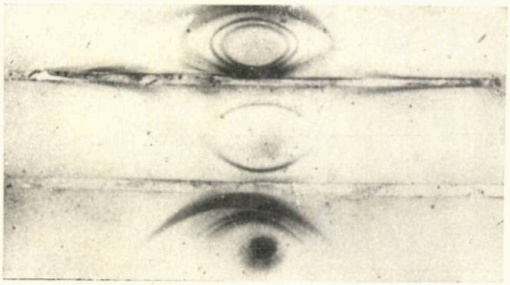


Fig. 4. — Imunoelectroforegramele γ-globulinei fluorocromate brute și purificate.

I. γ-globulină fluorocromată brută.

II. γ-globulină fluorocromată purificată prin filtrare prin gel de Sephadex G – 50.

III. γ-globulină fluorocromată purificată prin cromatografie pe DEAE-celuloză.

Ser imun de iepure antiom; condițiile experimentale sînt date în text. Colorare cu amidoschwarz 10 B.

Analiza imunoelectroforetică a fracțiunii purificate pe DEAE-celuloză arată dispariția celor trei linii de precipitare caracteristice proteinelor de balast care impurificau precipitatul brut de γ-globulină (fig. 4, *III*). Cum aceste impurități fluorescente pot reacționa nespecific în colorarea imunofluorescentă cu componentele tisulare, formînd combinații stabile, apare evident că îndepărtarea lor din preparatele de anticorpi (γ-globuline) poate anula colorarea nespecifică a preparatului microscopic. În felul acesta se elimină etapa de absorbție cu pulbere de țesut, care cauzează pierderi de substanță activă, permite contaminarea bacteriană și furnizează preparate instabile [13].

Din experiențele noastre apare clar că cromatografia pe DEAE-celuloză este cea mai eficientă metodă de purificare a γ-globulinelor fluorescente.

CONCLUZII

1. Pe baza datelor din literatură s-a preparat clorura de *1*-dimetil-amino-naftalin-*5*-sulfonil sub formă cristalină.

2. A fost dovedită competiția proteinelor serice pentru fluorocrom în cursul conjugării. Albumina serică captează cea mai mare cantitate de clorură de DANSIL, globulinele fluorocromîndu-se doar într-o măsură neînsemnată. De aceea se recomandă pentru marcarea anticorpilor folosirea preparatelor purificate de anticorpi (γ-globuline) și nu antiseruri integrale.

3. Capacitatea fracțiunilor proteice de a lega clorura de DANSIL variază de la specie la specie. La pește și broască se fluorocromează toate fracțiunile proteice, pe cînd la șobolani și om se fluorocromează numai anumite fracțiuni.

4. Fluorocromarea proteinelor serice poate fi realizată și *in vivo*, prin injectarea clorurii de DANSIL în animalele de experiență.

5. Purificarea conjugatelor fluorescente de substanțele de balast poate fi realizată prin filtrare pe gel sau cromatografie pe DEAE-celuloză. Ultimul procedeu este mai eficient, eliminînd atît clorura de DANSIL nereacționată cît și globulinele care impurifică preparatul de γ-globulină supus cuplării.

6. Filtrarea prin gel de Sephadex nu poate fi înlocuită prin prelucrarea preparatelor brute cu Sephadex G—25 sub formă uscată. În ultimul caz nu se elimină decît o parte din fluorocromul nereacționat.

Prezentată la redacție
la 6 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.

BIBLIOGRAFIE

1. Coons A. H., Kaplan M. H., *Localization of antigen of tissue cells. II. Improvement in a method of the detection of antigen by means of fluorescent antibody*, J. exp. Med., **91**, *1* (1950).

2. Riggs J. L., Seiwald R. J., Burckhalter J. H., Downs C. M., Metcalf T. G., *Isothiocyanat compounds as fluorescent labelling agents for immune serum*, Am. J. Pathol., **34**, 1 081 (1958).
3. Uehleke H., *Untersuchungen mit fluorescenz-markierten Antikörpern. IV. Die Markierung von Antikörpern mit Sulphochloriden fluoreszierender Farbstoffe*, Schweitz. Z. Path. Bakt., **22**, 724 (1959).
4. Ghadwick C. W., McEntegart M. G., Nairn R. C., *Fluorescent protein tracers. A trial of new fluorochromes and the development of an alternative to fluorescein*, Immunology, **1**, 315 (1958).
5. Riggs J. L., Loh P. C., Eveland W. C., *A simple fractionation method for preparation of fluorescein labelled gamma-globulin*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **105**, 655 (1960).
6. Mayersbach H., *Immunohistologische Methoden. II. Ein weiterer Markierungsfarbstoff: Dimethyl-1-Naphtylamin-sulfonsäure-5*, Acta Histochem. (Jena), **5**, 351 (1958).
7. Sokol F., Hána L., Albrect P., *Fluorescent antibody Method. Quantitative determination of 1-dimethylamino-naphtalene-5-sulfonic acid and protein in labelled γ-globulin*, Fol. microbiol., **6**, 145—150 (1961).
8. Pearse A. G. E., *Histochemistry, theoretical and applied*, Londra, J. and A. Churchill Ltd., 812 (1960).
9. Laurence D. J. R., *Fluorescence techniques for enzymologists*, în S. P. Colowick, N. D. Kaplan, *Methods in enzymology*, New York, Acad. Press, **IV**, 208—210 (1957).
10. Rinderknecht H., *A new technique for the fluorescent labelling of proteins*, Experientia, **16**, 430 (1960).
11. Rinderknecht H., *Ultra-rapid fluorescent labelling of proteins*, Nature, **193**, 167 (1962).
12. Nairn R. C., *Fluorescent protein tracing*, Edinburgh-Londra, E. & S. Livingstone Ltd., 90—96 (1962).
13. McDevitt H. O., Peters J. H., Pollard L. W., Harter J. G., Coons A. H., *Purification and analysis of fluoresceinlabelled antisera by column chromatography*, J. Immunol., **90**, 634 (1964).
14. Curtain C. C., *The chromatographic purification of fluorescent antibody*, J. Histochem. Cytochem., **9**, 484 (1961).
15. Killander J., Ponten J., Roden L., *Rapid reparation of fluorescent antibodies using gel-filtration*, Nature, **192**, 182 (1961).
16. Gordon M. A., Edwards M. R., Tompkins V. N., *Refinement of fluorescent antibody by gel filtration*, Proc. Soc. exp. Biol. Med., **109**, 96 (1962).
17. Cohn E. J., Gurd F. R. N., Surgenor D. M., Barnes B. A., Brown R. K., Derovaux G., Gillespie J. M., Kahnt F. W., Lever W. F., Liu C. H., Mittleman D., Mouton R. F., Schmidt K., Uroma E., *A system for the separation of the component of human blood. Quantitative procedures for the separation of the protein components of human plasme*, J. Am. Chem. Soc., **72**, 465 (1950).
18. Scheidegger J. J., *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
19. Ghetie V., Motet-Grigoraş D., *Electroforeza şi imunodifuzia proteinelor în gel de agarozâ*, St. cerc. biochimie, **5**, 409 (1962).
20. Tan King Bien, *Une méthode rapide de marquage de protéines avec l'isothiocyanate de fluorescéine à l'aide de Sephadex G-25 à l'état sec*, Rev. Franç. études clin. biol., **7**, 638 (1962).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 257–266, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

STUDII ENZIMATICE ÎN INTOXICAȚIA EXPERIMENTALĂ CU ARSEN

DE

A. SPORN și ILEANA DINU

Rezumat. — S-a cercetat pe 120 de șobolani albi tineri influența administrării arsenatului și arsenitului de sodiu asupra următorilor indicatori: proba de creștere (cîștigul săptămînal în greutate, ingestia de alimente, eficiența proteică), greutatea ficatului, conținutul său în proteine totale și acid dezoxiribonucleic, precum și activitatea enzimelor hepatice — succindehidrogenaza, aldolaza, transaminaza glutamic-aspartică, transaminaza glutamic-alaninică, catepsina, fosfataza acidă și fosfataza alcalină. Experiențele au durat 6 săptămîni, animalele fiind menținute la rații sintetice normoproteice (18% cazeină) sau hipoproteice (8% cazeină) care conțineau arsenit sau arsenat în doze de 1 și 10 ppm. Loturile martor au primit rații corespunzătoare, fără adaos de arsen.

Rezultatele obținute arată existența unei scăderi semnificative a activității succindehidrogenazei la loturile care au primit 1 ppm. arsenat, atît la rația normo- cît și la cea hipoproteică, și o creștere a activității enzimei la doza de 10 ppm. arsenat și arsenit, la rația normoproteică.

Activitatea fosfatazei acide crește semnificativ la administrarea a 1 ppm. arsenat.

Impurificarea produselor alimentare cu arsen constituie o problemă importantă pentru igienă, atît datorită toxicității arsenului cît și frecvenței cu care această impurificare se întîlnește în practică [18]. Imposibilitatea de a înlătura, în etapa actuală, contaminarea produselor alimentare cu arsen a făcut necesară limitarea acesteia prin stabilirea dozelor maxime admisibile.

Consfătuirea țărilor socialiste care a avut loc la Berlin în 1960 a stabilit ca limită maximă pentru arsen 1 ppm. în cazul utilizării produselor tratate cu preparate arsenicale, iar legislația în vigoare în S.U.A. indică drept limită 3,5 ppm. (2). În Anglia, concentrația maximă de arsen permisă în produsele alimentare este de 5 ppm. (1). Dacă la aceste cantități reziduale se adaugă arsenul provenit din utilaje, ambalaje, substanțe chimice utilizate în procesele tehnologice, rezultă că doza maximă admisibilă este mult depășită în practică.

În ultimii ani au apărut numeroase date cu privire la mecanismul de acțiune al arsenului, care pun la îndoială valabilitatea limitelor sta-

bilite. S-a demonstrat că *in vivo* arsenitul se combină cu grupele ditiolice din proteinele enzimatice, formînd mercaptide arsenicale [19]. Acest mecanism de blocare a enzimelor stă la baza inhibiţiei enzimelor din lanţul respirator [5], [9], [20]. Deosebit de importantă este decuplarea de către arsenat a fosforilării oxidative [9], [11], fapt care s-ar datora procesului de arsenoliză [19]. Cercetările recente în acest domeniu sugerează că arsenul afectează doar unul dintre sistemele enzimatice implicate în procesul fosforilării oxidative în mitocondrii [11], [21]. Totodată s-a stabilit că arsenul inhibă unele substanţe intermediare fosforilate, formate în cursul procesului respirator [9]. Decuplarea fosforilării oxidative de către arsen duce la o creştere a respiraţiei mitocondriale [20]. Acţiunea competitivă a arsenatului cu fosfatul duce de asemenea la o creştere a glicolizei, la stimularea de către arsen a descompunerii glucidelor şi esterilor hexozodifosforici [9]. Din unele cercetări se cunoaşte că arsenul înlocuieşte azotul din colină, iar arsenocolina formată nu mai acţionează ca donator de grupe metilice [19].

Datele arătate mai sus aduc elemente importante cu privire la mecanismul de acţiune al arsenului; nu permit însă să se aprecieze dacă modificările indicate au loc la dozele şi sub forma în care acesta se găseşte în produsele alimentare. În cercetările noastre ne-am propus să abordăm acest aspect al problemei.

METODA EXPERIMENTALĂ

Experienţele s-au efectuat pe 120 de şobolani albi, tineri, proveniţi din aceeaşi generaţie, de vîrstă şi greutate apropiată, împărţiţi în 15 loturi şi 3 serii experimentale.

În prima serie experimentală, pe 5 loturi de animale (40 de şobolani) s-a cercetat influenţa arsenului asupra activităţii succindehidrogenazei, aldolazei, transaminazei glutamic-aspartice şi transaminazei glutamic-alaninice din ficat.

În a doua serie experimentală, la 5 loturi (40 de animale) s-a determinat influenţa arsenului asupra activităţii aceloraşi enzime, însă la o raţie hipoproteică (cazeină 8%). Utilizarea unei raţii hipoproteice a fost justificată de faptul — demonstrat în cercetările noastre anterioare — că în aceste condiţii acţiunea toxicului devine mai evidentă [16]. De asemenea, cum arată unele date mai recente, toxicitatea arsenului în experienţe acute variază în funcţie de structura raţiei alimentare [14].

În a treia serie experimentală, pe 5 loturi (40 de animale), la o raţie de 18% cazeină, s-a cercetat influenţa arsenului asupra activităţii catepsinei, fosfatazei acide şi fosfatazei alcaline din ficat.

Ca indicatori toxicologici generali, s-au utilizat: proba de creştere (cîştigul săptămînal în greutate, ingestia şi eficienţa proteică), greutatea ficatului, precum şi conţinutul său în proteine şi acid dezoxiribonucleic.

În toate experienţele, animalele au fost menţinute în cuşti individuale, la o raţie sintetică ce conţinea cazeină 18%, amidon de porumb 64%, ulei 8%, drojdie de bere uscată

4%, amestec de săruri Osborne Mendel 4%, agar agar 2%. O dată pe săptămînă animalele primeau *per os* 270 u.i. vit. A, 100 u.i. vit. D_2 și 1 u.i. vit. E, dizolvate în 0,1 ml ulei de floarea-soarelui.

Pentru a reproduce condițiile existente în practică, adică ingestia arsenului rezidual din alimente, arsenul a fost inclus în rația sintetică sub formă de arsenat și arsenit de sodiu în concentrație de 1 ppm. și de 10 ppm.

Doza de 1 ppm. reprezintă o doză egală sau chiar mai mică decît cea admisă actualmente în alimente, deci presupusă ca netoxică, iar doza de 10 ppm. este de aproximativ 2—10 ori mai mare decît cea permisă.

Testarea toxicității arsenatului și arsenitului a fost determinată de faptul că în practică există posibilitatea contaminării produselor alimentare cu ambele substanțe și că mecanismul lor de acțiune este diferit [9], [19].

Proba de creștere s-a efectuat timp de 6 săptămîni, înregistrîndu-se o dată la 2 zile ingestia de alimente și la 6 zile greutatea corporală. Pe baza raportului dintre cîștigul în greutate și ingestia s-a calculat indicele de eficiență proteică. La sfîrșitul experienței, animalele au fost sacrificate prin decapitare, activitatea enzimatică determinîndu-se în omogenatul hepatic cu 10% manitol.

Activitatea succindehidrogenazei, aldolazei, transaminazei glutamic-aspartice, a transaminazei glutamic-alaninice, precum și conținutul în acid dezoxiribonucleic al ficatului s-au determinat cu ajutorul metodelor indicate într-o lucrare anterioară [17].

Activitatea catepsinei s-a determinat cu ajutorul metodei lui Anson [4], cea a fosfatazei acide după metoda indicată de Franklin [8] și a fosfatazei alcaline după Rosenthal [15]. Proteinele hepatice s-au dozat spectrofotometric prin metoda Aldrige [13].

REZULTATELE OBȚINUTE

I. Influența administrării arsenului asupra creșterii șobolanului alb, asupra greutății ficatului și conținutului său în proteine totale și acid dezoxiribonucleic

Proba de creștere. Cum rezultă din tabela nr. 1, în prima experiență se înregistrează o greutate corporală mai mică, la lotul care a primit 1 ppm. arsenat. În a doua experiență, greutatea corporală e mai redusă la lotul care a primit 10 ppm. arsenat și 1 ppm. arsenit. În a treia experiență greutatea este mai scăzută la lotul care a primit 10 ppm. arsenat. Cu toate că scăderea în greutate se observă mai frecvent la loturile care au primit arsenat, nici una dintre diferențele înregistrate nu este reproductibilă și semnificativă din punct de vedere statistic.

Ingestia de alimente prezintă oscilații neconcludente în prima experiență și o tendință de creștere la loturile care au primit arsen în a treia experiență. Diferențele față de lotul martor sînt semnificative numai la lotul care a primit 1 ppm. arsenat în a treia experiență. La rația hipoproteică, administrarea arsenului determină o tendință de scădere a ingestiei, diferențele față de lotul martor fiind semnificative la loturile care au primit 1 ppm. arsenit și 1 ppm. arsenat.

Eficiența proteică. Este mai scăzută la loturile care au primit arsen în ambele experiențe în care s-a utilizat o rație normoproteică, valorile

Tabela nr. 1

Influența arsenului asupra creșterii șobolanului alb (date medii pe lot)

Experiența I. Cazeină 18%

Loturile	Nr. anim.	Greutate inițială		Greutate finală			Ingestia medie			Eficiența proteică		
		medie	E.S.	medie	E. S.	P. *	în gr.	E. S.	P.	medie	E. S.	P.
I. Martor	8	43,9	0,6	175,9	10,7		423	19,9		1,72	0,08	
II. Arsenit 1 ppm.	8	43,8	0,7	171,9	10,3	>0,05	419	21,7	>0,05	1,71	0,08	>0,05
III. ,, 10 ppm.	8	43,9	0,6	176,4	12,2	>0,05	441	26,1	>0,05	1,68	0,09	>0,05
IV. Arsenat 1 ppm.	8	43,9	0,7	164,5	12,7	>0,05	400	23,6	>0,05	1,68	0,06	>0,05
V. ,, 10 ppm.	8	43,8	0,4	171,8	13,6	>0,05	454	26,1	>0,05	1,58	0,07	>0,05

Experiența a II-a. Cazeină 8%

I. Martor	8	43,8	0,5	143,8	7,2		474	13,4		2,69	0,14	
II. Arsenit 1 ppm.	8	43,9	0,4	132,6	4,7	>0,05	414	11,7	<0,05	2,78	0,10	>0,05
III. ,, 10 ppm.	8	43,9	0,5	143,3	8,3	>0,05	441	21,0	>0,05	2,95	0,12	>0,05
IV. Arsenat 1 ppm.	8	43,8	0,7	143,1	6,9	>0,05	435	12,9	>0,05	2,90	0,10	>0,05
V. ,, 10 ppm.	8	43,8	0,7	131,9	8,1	>0,05	435	15,5	>0,05	2,59	0,14	>0,05

Experiența a III-a. Cazeină 18% (control)

I. Martor	8	40,3	0,6	151,8	6,9		418	16,0		1,47	0,09	
II. Arsenit 1 ppm.	8	40,3	0,7	148,1	7,2	>0,05	436	25,3	>0,05	1,37	0,06	>0,05
III. ,, 10 ppm.	8	40,3	0,6	148,8	7,2	>0,05	434	14,4	>0,05	1,38	0,06	>0,05
IV. Arsenat 1 ppm.	8	40,3	0,7	149,0	8,5	>0,05	465	11,4	<0,05	1,28	0,07	>0,05
V. ,, 10 ppm.	8	40,3	0,7	144,3	6,0	>0,05	453	18,5	>0,05	1,27	0,04	<0,05

* Testul Pearson.

cele mai scăzute înregistrîndu-se la administrarea dozei de 10 ppm. arsenat. Diferențele față de loturile martor sînt semnificative numai în experiența a treia, la lotul cu 10 ppm. arsenat. La rația hipoproteică se înregistrează o eficiență proteică mai bună (nesemnificativă statistic) la loturile care au primit respectiv 10 ppm. arsenit și 1 ppm. arsenat.

Greutatea ficatului. Valorile cele mai scăzute ale greutății ficatului se înregistrează la lotul care a primit 1 ppm. arsenit în experiența I și a II-a și 10 ppm. arsenat în experiența a III-a. Diferențele sînt semnificative numai în cazul administrării a 10 ppm. arsenat în experiența a III-a.

Conținutul în proteine și acid dezoxiribonucleic al ficatului. Administrarea arsenului nu a influențat acești indicatori, neînregistrîndu-se tendințe sau modificări semnificative.

II. Influența arsenului asupra activității unor enzime hepatice

Activitatea succindehidrogenazei. La animalele menținute la o rație normoproteică se înregistrează o creștere semnificativă a activității succindehidrogenazei la loturile care au primit 10 ppm. arsenit, respectiv 10 ppm. arsenat, și o scădere a activității la lotul căruia i s-a administrat 1 ppm. arsenat (tabela nr. 2).

La rația hipoproteică se înregistrează o scădere semnificativă a activității enzimei în raport cu martorul care a primit rația normoproteică, precum și o tendință de scădere la toate loturile care au primit arsen. Din punct de vedere statistic, diferențele față de lotul martor sînt semnificative numai în cazul administrării a 1 ppm. arsenat.

Activitatea aldolazei hepatice. Valorile activității aldolazei oscilează în ambele experiențe între 1,12 și 1,19 unități, neînregistrîndu-se diferențe semnificative între loturi (tabela nr. 2).

Activitatea transaminazei glutamic-aspartice. Valorile obținute oscilează între 79 și 90 micromoli piruvat/oră/g ficat umed în prima experiență și 82—92 micromoli în a doua, fără a se înregistra vreo diferență semnificativă între loturi (tabela nr. 2).

Activitatea transaminazei glutamic-alaninice. Administrarea arsenului nu a influențat activitatea enzimei, valorile obținute oscilînd în ambele experiențe între 122 și 128 micromoli piruvat/oră/g ficat umed (tabela nr. 2).

Activitatea catepsinei. La loturile care au primit arsen se înregistrează o tendință de scădere a activității catepsinei, mai marcată la administrarea arsenului. Diferențele între loturi nu sînt însă semnificative din punct de vedere statistic (tabela nr. 3).

Activitatea fosfatazei acide. Rezultatele obținute (tabela nr. 3) arată că activitatea fosfatazei acide oscilează la majoritatea loturilor între 16 și 17 micromoli P/20 min/g ficat umed. O excepție constituie lotul care a primit 1 ppm. arsenit, care prezintă o creștere net semnificativă ($p = 0{,}003$) a activității fosfatazei acide.

Tabela nr. 2

Influența arsenului asupra activității succindehidrogenazei, aldolazei, transaminazei glutamic-aspartice și transaminazei glutamic-alaninice din ficat (date medii pe lot)

Loturile	Succindehidrogeneza (formazan/1 mg ficat)			Aldolaza (unități/1 mg ficat)			GOT (μM piruvat/1 g ficat)			GPT (μM piruvat/1 g ficat)		
	medie	E.S.	P.	medie	E.S.	P.	medie	E.S.	P.	medie	E.S.	P.
Experiența I. Cazeină 18%												
I. Martor	1,15	0,06		1,16	0,02		79	5,0		125	2,2	
II. Arsenit 1 ppm.	1,12	0,06	>0,05	1,15	0,02	>0,05	87	5,6	>0,05	122	1,8	>0,05
III. Arsenit 10 ,,	1,32	0,06	<0,05	1,12	0,02	>0,05	89	3,8	>0,05	125	1,6	>0,05
IV. Arsenat 1 ,,	0,95	0,05	<0,05	1,19	0,01	>0,05	90	6,2	>0,05	122	2,1	>0,05
V. Arsenat 10 ,,	1,33	0,06	<0,05	1,14	0,01	>0,05	80	3,6	>0,05	127	2,4	>0,05
Experiența a II-a. Cazeină 8%												
I. Martor	0,92	0,06	<0,05	1,12	0,02	>0,05	84	2,8	>0,05	126	1,8	>0,05
II. Arsenit 1 ppm.	0,82	0,07	>0,05	1,15	0,02	>0,05	89	2,2	>0,05	125	1,3	>0,05
III. Arsenit 10 ,,	0,82	0,12	>0,05	1,16	0,02	>0,05	84	5,6	>0,05	128	2,1	>0,05
IV. Arsenat 1 ,,	0,68	0,08	<0,05	1,14	0,04	>0,05	82	4,8	>0,05	123	3,8	>0,05
V. Arsenat 10 ,,	0,86	0,06	>0,05	1,19	0,03	>0,05	92	6,5	>0,05	122	1,0	>0,05

Tabela nr. 3

Influența arsenului asupra activității catepsinei, fosfatazei acide și fosfatazei alcaline din ficat (date medii pe lot la g ficat umed)

Loturile	Catepsina (mg tirozină/10 min, 1 g ficat)			Fosfataza acidă micromoli			Fosfataza alcalină P în 20 min		
	media	E.S.	P.	media	E.S.	P.	media	E.S.	P.
I. Martor Cazeină 18%	2,23	0,17		17	0,53		19	1,30	
II. Arsenit 1 ppm.	2,16	0,21	>0,05	24	2,23	<0,003	21	2,39	>0,05
III. Arsenit 10 ppm.	1,98	0,12	>0,05	16	0,53	>0,05	17	0,84	>0,05
IV. Arsenat 1 ppm.	1,87	0,12	>0,05	17	1,30	>0,05	17	1,19	>0,05
V. Arsenat 10 ppm.	1,91	0,16	>0,05	17	0,75	>0,05	18	1,19	>0,05

Activitatea fosfatazei alcaline. Valorile înregistrate (tabela nr. 3) oscilează între 17 și 21 micromoli P/20 min/g ficat umed, fără a se înregistra vreo tendință sau diferență semnificativă.

DISCUȚII

Rezultatele obținute arată că în condițiile noastre experimentale administrarea a 1 ppm. arsen în rația animalelor, ceea ce reprezintă aproximativ 15—20 gama arsenat sau arsenit pe zi, a produs modificări semnificative în activitatea succindehidrogenazei și a fosfatazei acide din ficat.

Scăderea activității succindehidrogenazei la administrarea a 1 ppm. arsenat indică existența unei acțiuni inhibitorii asupra oxidării succinatului. O acțiune inhibitorie redusă a arsenatului asupra lanțului respirator a fost semnalată și de alți autori [10]. Creșterea activității succindehidrogenazei la administrarea a 10 ppm. arsenat sau arsenit poate fi interpretată ca o stimulare a oxidării succinatului în prezența arsenului. Cuvelier și colab. [5], în cercetări recente, constată că administrarea arsenitului de sodiu în concentrație de 10^{-5} moli pe litru crește oxidarea substanțelor din lanțul respirator cu aproximativ 10%.

În interpretarea rezultatelor obținute în experiențele cu utilizarea rației hipoproteice trebuie ținut seama de faptul că lotul martor prezintă valori semnificativ scăzute în raport cu martorul care a primit rația normoproteică. Scăderea activității succindehidrogenazei la rații hipoproteice este interpretată ca un efect al reducerii sintezei proteinelor enzimatice în aceste condiții [12], [13].

Faptul că la rația hipoproteică nu se mai înregistrează o creștere a activității succindehidrogenazei la administrarea a 10 ppm. arsenat sau arsenit poate fi atribuit de asemenea carenței proteice.

Rezultatele noastre privind variațiile succindehidrogenazei la dozele studiate nu sînt suficiente pentru a putea aprecia gradul de nocivitate a arsenului. Faptul că succindehidrogenaza înregistrează modificări permite să se emită ipoteza că arsenul, în dozele utilizate, ar avea o in-

fluenţă asupra întregii respiraţii celulare şi asupra fosforilării oxidative, modificări considerate actualmente ca primele simptome ale intoxicaţiei cu arsen [9], [19]. Lămurirea acestui aspect al problemei constituie obiectul cercetărilor noastre actuale.

Creşterea activităţii fosfatazei acide, observată de noi la administrarea a 1 ppm. arsenit, a fost înregistrată şi de Kanda şi Takahama [10] în experienţe pe iepuri intoxicaţi cu doze mici de arsen. Datele existente în literatură indică o scădere a activităţii fosfatazice [10] şi o creştere tranzitorie a activităţii transaminazelor glutamic-aspartice şi glutamic-alaninice [7] la iepuri intoxicaţi cu doze relativ mari de arsen. Faptul că în experienţele noastre nu se înregistrează asemenea modificări se datoreşte, probabil, dozelor mici de arsen utilizate.

Tendinţa de descreştere a activităţii catepsinei concordă cu rezultatele obţinute de Kanda şi Takahama [10], care obţin de asemenea o scădere a activităţii enzimei la iepuri intoxicaţi cu arsen.

Unele date din literatură pledează pentru existenţa unei influenţe a arsenului asupra activităţii aldolazei hepatice. Astfel, Meyerhof (citat de [9]) constată o modificare a oxidării fructozei, iar Engelhard şi Braunstein (citaţi de [9]) o stimulare a descompunerii hexozodifosfatului sub influenţa arsenului. Needham şi colab. (citaţi de [9]) obţin în prezenţa arsenatului o descompunere a hexozodifosfatului de către extractele celulare. Fabroni [6] constată o creştere tranzitorie a activităţii aldolazei serice la iepuri intoxicaţi cu arsen.

Faptul că în cercetările noastre nu constatăm o variaţie a activităţii aldolazei hepatice poate fi atribuit dozelor mici de arsen utilizate.

Prezentată la redacţie
la 14 decembrie 1963

Secţia de igiena alimentaţiei,
Institutul de igienă şi protecţia muncii,
Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. Fao Ofal, Législation récente, **28**, 179—181 (1959).
2. Fao Ofal, Législation récente, **57**, 557—627 (1962).
3. Aldrige W. N., Biochem. J., **67**, 423—431 (1957).
4. Anson M. L., J. Gen. Physiol., **22**, 79 (1939).
5. Cuvelier R., Troche P., Andrani G., C. R. Soc. Biol., **155**, 763—769 (1961).
6. Fabroni F., Folia Med., **45**, 430—434 (1962).
7. Fabroni F., Folia Med., **45**, 337—341 (1962).
8. Franklin T. J., Biochem. J., **82**, 118 (1962).
9. Guberniev M. A., Torbocikina L. I., Vestn. Akad. Med. Nauk SSSR, **17**, *12*, 71—82 (1962).
10. Kanda I., Takahama K., Okayama Igakkai Zasshi, **74**, 151 (1962); Chem. Abstr., **58**, 14 616 *a*. (1963).
11. Lehninger A. L., J. Biol. Chem., **178**, 625—644 (1949).
12. Miller L. L., J. Biol. Chem., **186**, 253 (1950).
13. Muramatsu K., Ashida Kiyoshi, Journ. Nutr., **79**, *3*, 365—372 (1963).

14. PACKMAN E. W., DONALD D. A., HARRISSON J. W. E., J. Agricult. Food Chem., **9**, 271—272 (1961).
15. ROSENTHAL O., FALL J. C., VARS H. M., J. Biol. Chem., **194**, 299 (1952).
16. SPORN A., Igiena, **3**, 33—47 (1956).
17. SPORN A., DINU ILEANA, Biochimia, **1** (1964).
18. STENBERG A. I., *Naucinîie trudi Instituta pitania AMN SSSR*, Moscova, 11—29 (1948).
19. VALLU B. L., ULMER D. D., WACKER M. D., Arch. Ind. Health, **21**, 2, 132—151 (1960).
20. VOINAR A. O., Sov. nauka, 323—335 (1953).
21. WADKINS C. L., Biochem. Biophys. Res. Comm. **7**, 70—75 (1962).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 267–278, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

POLAROGRAFIA PROTEINELOR CEREBRALE ACVOSOLUBILE ÎN FILOGENIE

DE

MIHAIL ȘERBAN

Rezumat. — Proteinele cerebrale acvosolubile în filogenie se caracterizează, din punct de vedere polarografic, printr-o comportare în general asemănătoare, dovedită atît prin activitatea lor la interfața mercur/soluție, cît și prin activitatea catalitică a tiogrupărilor. Prin cercetările polarografice efectuate în diferite variante experimentale s-a arătat că natura proteinelor cerebrale solubile este asemănătoare în scara filogenetică a creierului și că există un paralelism între aceste proteine și proteinele serice normale de natură globulinică. „Filtratele" proteinelor cerebrale solubile prezintă o activitate similară în filogenie, identificîndu-se compuși de natură mucoprotidică asemănători cu cei semnalați în cazul proteinelor serice normale. Datele polarografice obținute subliniază unitatea proteinelor cerebrale solubile în filogenie (cel puțin pentru cazurile cercetate).

Se confirmă astfel, paralel cu eterogenitatea diferită a acestor proteine ca expresie a evoluției filogenetice, existența unui fond comun în cadrul acestei evoluții, fapt dovedit anterior și pe alte căi experimentale.

Cercetările anterioare [1–3] în domeniul proteinelor cerebrale acvosolubile au scos în evidență o serie de proprietăți și unele caracteristici ale acestor proteine în filogenia creierului. Din generalizarea datelor obținute a reieșit că proteinele cerebrale acvosolubile prezintă din punctul de vedere al evoluției filogenetice atît o diversitate cît și o unitate. În vederea completării acestor date, ne-am propus extinderea cercetărilor de biochimie comparată a proteinelor cerebrale sub aspect polarografic. Spre deosebire de metodele utilizate de noi anterior, metoda polarografică se adresează, principial, altor însușiri ale moleculelor proteice, ceea ce permite implicit o caracterizare mai amplă a proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie.

MATERIAL ȘI METODE

În cercetarea polarografică a proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie s-a urmărit: *a*) activitatea interfacială; *b*) relația dintre valoarea undei catalitice și concentrația proteică; *c*) activitatea polarografică a proteinelor cerebrale denaturate chimic; *d*) activitatea polaro-

grafică a proteinelor cerebrale hidrolizate enzimatic ; *e*) activitatea polarografică a „filtratelor" proteice.

Ca material de cercetare ne-au servit proteinele acvosolubile obţinute din creierul de peşte (*Cyprinius carpio*), amfibie (*Rana ridibunda*), reptilă (*Emys orbicularis*), pasăre (porumbel), mamifer (şobolan şi bou). Modul şi condiţiile de extracţie a proteinelor cerebrale acvosolubile, precum şi căile de prelucrare pînă la etapa analitică, au fost identice cu cele descrise anterior [1], [2], [3]. Cercetarea comparativă a acestor proteine a impus stabilirea prealabilă a unui criteriu comun care să permită compararea rezultatelor obţinute în cazul proteinelor provenite de la diferitele trepte de evoluţie filogenetică a creierului. De aceea concentraţiile soluţiilor de proteine extrase au fost ajustate prin diluţie (soluţie NaCl 0,15 N) la o valoare constantă (200 mg% ml pentru unele variante şi 300 mg% ml pentru alte variante), astfel aleasă, încît variantele menţionate să se poată realiza în condiţii experimentale corespunzătoare.

a) Activitatea interfacială a proteinelor cerebrale, exprimată ca putere suprimată, a fost urmărită în prezenţa maximului negativ al cobaltului, folosind în acest scop însuşi mediul cobalto-amoniacal în care se desfăşoară reacţia catalitică a proteinelor. Scăderea maximului polarografic al cobaltului s-a realizat prin adăugarea succesivă de soluţie proteică, în concentraţii cuprinse între 4.10^{-2} şi 2.10^{-1} mg/ml, la 2,5 ml suport electrolitic : $[Co(NH_3)_6]Cl_3$. 1.10^{-3} N, NH_4Cl 1.10^{-1} N şi NH_4OH 1.10^{-1} N. Determinările au fost efectuate la volum constant, variindu-se raportul dintre volumul soluţiei proteice şi soluţia fiziologică de clorură de sodiu. Înregistrările s-au făcut între —0,8 V şi —1,3 V, iar din curba de adsorbţie trasată s-a calculat, prin interpolare, concentraţia proteică ce suprimă maximul polarografic cu 50% din valoarea sa iniţială şi care exprimă puterea suprimantă a macromoleculelor proteice. Condiţii de polarografiere : tensiunea = 3,8 V; sensibilitatea galvanometrului = 1/70; timpul de picurare = 2,8 s ; temperatura = +23°C.

b) Relaţia dintre valoarea (înălţimea) undei polarografice proteice şi concentraţia proteică a fost stabilită prin polarografierea în mediu cobalto-amoniacal (Co^{III}) a soluţiilor de proteine cerebrale, limitele de concentraţie fiind cuprinse între 2.10^{-1} şi 12.10^{-1} mg/ml. Ca şi în cazul anterior, determinările au fost efectuate la volum constant ; înregistrările undelor au fost făcute între —0,8 V şi —1,7 V, în aceleaşi condiţii ca la punctul *a*). Din valorile înălţimii celor două maxime ale undei catalitice proteice, în dependenţă de concentraţia proteică, s-au determinat curba $h = f(c)$ şi caracteristicile ei în cazul filogeniei proteinelor cerebrale.

c) Comportarea polarografică a proteinelor cerebrale acvosolubile în procesul denaturării chimice a fost urmărită folosind ca agent denaturant hidroxidul de potasiu. La 0,5 ml soluţie proteică 200 mg% ml s-au adăugat 0,2 ml KOH 1 M; din această probă s-a luat cîte 0,1 ml şi s-a polarografiat la următoarele intervale de timp : 0, 10, 20, 40, 60 şi 150 min. Paralel s-a făcut şi o probă martor, la care volumul de KOH a fost substituit cu un volum egal de soluţie 0,15 M NaCl, această probă fiind polarografiată după aceleaşi intervale de timp. Dat fiind efectul KOH în timp, respectiv gradul de denaturare a moleculei proteice, determinările polarografice au fost efectuate atît în prezenţa Co^{III} , cît şi a Co^{II}. În primul caz, la 2,5 ml soluţie test $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ 1.10^{-3} N, NH_4Cl 1.10^{-1} N, NH_4OH 1.10^{-1} N s-au adăugat, în condiţiile amintite, cîte 0,1 ml din probele de proteine denaturate şi nedenaturate ; în al doilea caz, la 2 ml soluţie $CoCl_2$ 4.10^{-3} N s-au adăugat 0,5 ml NH_4Cl 1 N , 0,5 ml NH_4OH1N şi cîte 0,1 ml din probele de proteine denaturate şi nedenaturate. Condiţii de polarografiere : tensiunea = 3,8 V; sensibilitatea galvanometrului = 1/70, respectiv 1/50; timpul de picurare = 2,8 s ; temperatura = +23°C.

d) Unele determinări polarografice au fost efectuate şi în legătură cu procesul de hidroliză enzimatică a proteinelor cerebrale acvosolubile. Ne-am limitat deocamdată numai la cele provenite din creierul de bou, luînd în considerare faptul că proteinele acvosolubile din creierul de mamifer prezintă, după cum am arătat, o heterogenitate mare în tipuri de proteine. Hidroliza enzimatică a fost aplicată în scopul corelării datelor obţinute prin acest procedeu cu cele obţinute la denaturarea alcalină, la separarea în cîmp electric sau la fracţionarea chimică a proteinelor cerebrale. Am considerat totodată că metoda polarografică poate da indicaţii nu numai asupra procesului hidrolitic ca atare, ci şi asupra naturii, respectiv comportării proteinelor cerebrale acvosolubile în acest proces (Unele rezultate cu privire la hidroliza enzimatică a proteinelor cerebrale, bazate de altfel pe concluziile cercetărilor publicate anterior, au fost obţinute în laboratorul nostru şi parţial publicate [4]). Ca enzimă proteolitică s-a folosit tripsină (Merck) în concentraţie de 1%, iar ca substrat o soluţie de proteine cerebrale acvosolubile cu concentraţia 1,2—1,5 g%, raportul enzimă/substrat fiind 1/10. Hidroliza enzimatică s-a efectuat la +38°C şi la valori de pH cuprinse între 6,5 şi 10, pH-ul optim de acţiune a tripsinei asupra proteinelor cerebrale fiind de 7,4—7,8 (tampon Britton-Robinson : CH_3COOH 4.10^{-2} M, H_3BO_3 4.10^{-2} M, NaOH 2.10^{-1} M, sau tampon fosfaţi); hidroliza a fost urmărită la următoarele intervale de timp : momentul iniţial, 1 oră, 2, 4, 6, 24, 48 şi 54 de ore. În paralel au fost analizate polarografic, în aceleaşi condiţii, probe conţinînd enzimă fără substrat sau substrat fără enzimă. Determinările polarografice s-au efectuat în mediu amoniacal de Co^{III}, la 3 ml din această soluţie adăugîndu-se cîte 0,1 ml atît din probele supuse hidrolizei cît şi din probele martor. Condiţii de polarografiere identice cu cele de la punctul *c*).

e) Efectuarea reacţiei polarografice a „filtratului" a comportat realizarea în prealabil a două etape experimentale, şi anume : 1. deproteinizarea ca atare cu acid sulfosalicilic a proteinelor cerebrale solubile şi 2. denaturarea alcalină parţială a acestor proteine, urmată de deproteinizarea cu acid sulfosalicilic. În primul caz, la 0,2 ml soluţie proteică 200 mg% ml s-a adăugat 0,1 ml soluţie 0,15 N NaCl ; în al doilea caz, la 0,2 ml soluţie proteică de aceiaşi concentraţie s-a adăugat 0,1 ml soluţie KOH 1 N. Ambele probe s-au lăsat în repaus 60 min la temperatura camerei, după care s-a adăugat fiecăreia cîte 0,2 ml dintr-o soluţie 20% acid sulfosalicilic, agitîndu-se puternic. După 15 minute, probele s-au centrifugat la 3 500 g timp de 10 min ; s-a preferat această operaţie celei de filtrare, în care caz se pot produce reţineri de compuşi polarografic activi, neprecipitaţi. Analiza polarografică a supernatantelor obţinute, pe care le vom denumi generic „filtrate" proteice, s-a făcut prin adăugarea a 0,2 ml din aceste supernatante, provenite de la proteinele denaturate şi nedenaturate la 2,5 ml suport electrolitic : $[Co(NH_3)_6]Cl_3$ 1.10^{-3} N, NH_4Cl 1.10^{-1} N, NH_4OH 1.10^{-1} M. Condiţii de polarografiere : tensiunea = 3,8 V ; sensibilitatea galvanometrului = 1/30 ; timpul de picurare = 2,8 s ; temperatura = + 23°C.

În toate experienţele menţionate s-a utilizat polarograful Heyrovsky, tip V. 301.

REZULTATE ŞI INTERPRETAREA LOR

Cercetarea polarografică a relevat faptul că proteinele cerebrale acvosolubile se caracterizează în filogenie printr-o comportare în general comună care reflectă natura lor şi subliniază trăsătura de unitate, evidenţiată de noi şi pe alte căi experimentale.

Astfel, din analiza rezultatelor obținute reiese că proteinele cerebrale acvosolubile prezintă o activitate interfacială asemănătoare, indiferent de gradul de evoluție filogenetică a creierului. Valoarea acestei activități (ca putere suprimată a maximului polarografic al cobaltului)

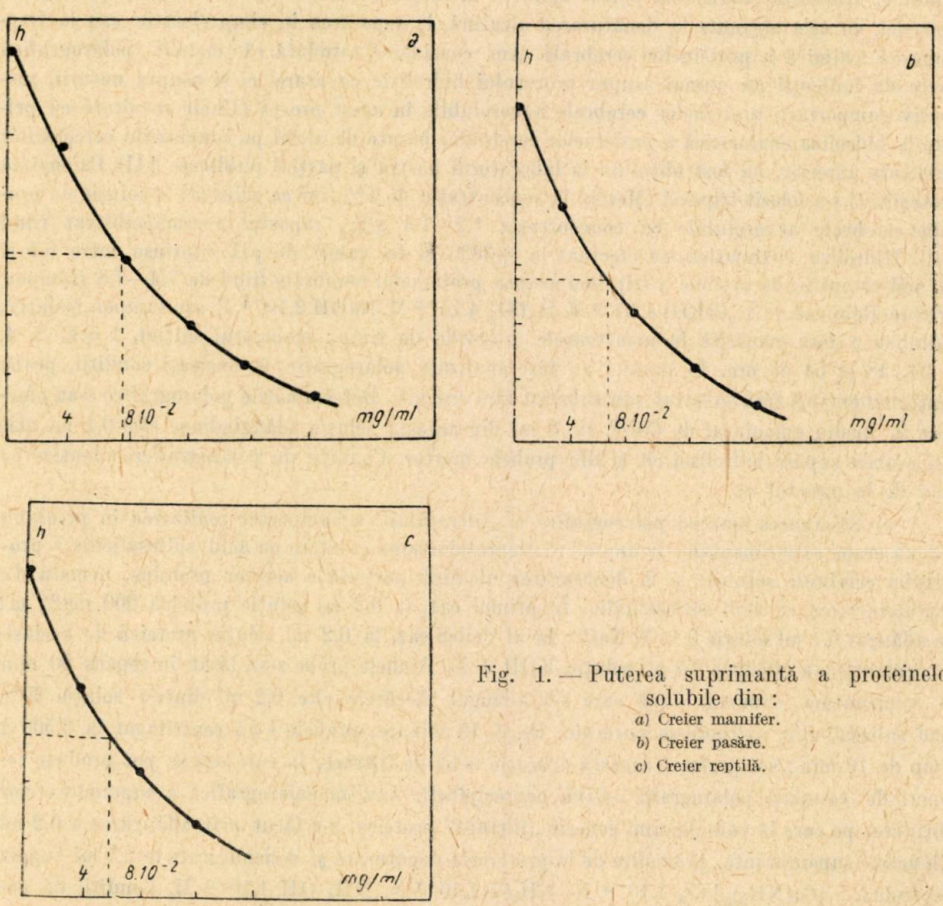


Fig. 1. — Puterea suprimantă a proteinelor solubile din :
a) Creier mamifer.
b) Creier pasăre.
c) Creier reptilă.

este cuprinsă între $6{,}4.10^{-2}$ și $7{,}6.10^{-2}$ mg/ml. Aceste limite extreme, ca și valorile intermediare, nu pot constitui un criteriu de diferențiere în activitatea interfacială a proteinelor acvosolubile din creier în funcție de proveniența lor. Din contră, putem admite că comportarea la interfața mercur/soluție a acestor proteine în filogenie denotă o asemănare a naturii, a macrostructurii, ca și a raportului hidrofilie/lipofilie a moleculelor proteice. Acești factori acționează ca o rezultantă la interfață, determinînd valori apropiate ale puterii de adsorbție. Este de remarcat că, deși proteinele cerebrale acvosolubile manifestă în filogenie grade diferite de eterogenitate, totuși, așa cum am arătat [2], [3], pe baza

proprietăților de solubilitate salină ele prezintă o natură în general asemănătoare; de asemenea separarea electroforetică a proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie [1] ne-a indicat că aproximativ 90% din aceste proteine par să fie de natură „globulinică". Deci, o serie de trăsături comune ale proteinelor cerebrale în filogenie se reflectă și în activitatea lor interfacială, asemănătoare ca valoare în scara filogenetică a creierului. În figura 1 sînt prezentate cîteva curbe care exprimă efectul supresiv al proteinelor cerebrale acvosolubile față de maximul polarografic al cobaltului.

O comportare polarografică similară a proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie a fost constatată și în cadrul unui alt grup de reacții polarografice, care se adresează prezenței și efectului catalitic al grupărilor tiolice și disulfidice. Rezultatele obținute în această direcție confirmă datele cu privire la activitatea interfacială a proteinelor din creier în filogenie, ceea ce subliniază caracterele în general asemănătoare ale acestor proteine, luate în ansamblul lor.

Astfel, cercetîndu-se relația dintre valoarea curentului catalitic (exprimată ca înălțime a maximelor I și II ale dublei unde proteice) și concentrația proteică (relație care poate avea anumite caracteristici în funcție de natura și particularitățile moleculelor proteice de proveniențe diferite), s-a stabilit că aspectul curbelor care reprezintă această dependență este similar pentru proteinele acvosolubile provenite de pe diferite trepte de evoluție filogenetică a creierului (fig. 2). Porțiunea liniară a curbelor se extinde, pentru toate cazurile cercetate, în același domeniu de concentrație proteică (0—0,60 mg/ml), iar concentrația corespunzătoare punctului de inflexiune al curbei este de asemenea practic identică pentru proteinele cerebrale în filogenie. Din tabela nr. 1 rezultă că, pentru proteinele solubile din creier, în filogenie această valoare — în cazul ambelor maxime ale undei proteice — este cuprinsă între 0,50 și 0,58 mg/ml. Din figura 2 mai rezultă că variația raportului celor două maxime (h_2/h_1) este de asemenea similară la proteinele cerebrale în filogenie, constatîndu-se prezența a două puncte de discontinuitate, în jurul valorilor de concentrație 0,2—0,4 mg/ml și 0,8—1,0 mg/ml.

Activitatea polarografică a proteinelor cerebrale în filogenie la interfața mercur/soluție și activitatea lor catalitică au impus investigarea acestor proteine și prin alte procedee experimentale, care să confirme datele obținute și să aducă unele precizări suplimentare în legătură cu natura lor. De aceea, pornind de la premisa că denaturarea determină anumite modificări ale macrostructurii proteinelor, în funcție de natura acestora, am recurs la cercetarea polarografică a procesului de denaturare alcalină a lor.

Și prin acest procedeu s-a dovedit că deși proteinele cerebrale, spre deosebire de alte proteine, prezintă anumite caracteristici la denaturarea alcalină, ele manifestă totuși în filogenie o comportare similară. Se remarcă astfel (fig. 3) că denaturarea alcalină nu produce o activare marcantă a proteinelor cerebrale, în sensul creșterii efectului lor polarografic datorită deplierii moleculelor sau eliberării consecutive de grupări sulfhidrilice sau disulfidice polarografic active. Or, este cunoscut, de exemplu,

că la proteinele serice [5], [6], [7] denaturarea produce inițial o mărire evidentă a efectului polarografic, agentul denaturant acționînd asupra configurației moleculelor proteice de un anumit tip în sensul eliberării la

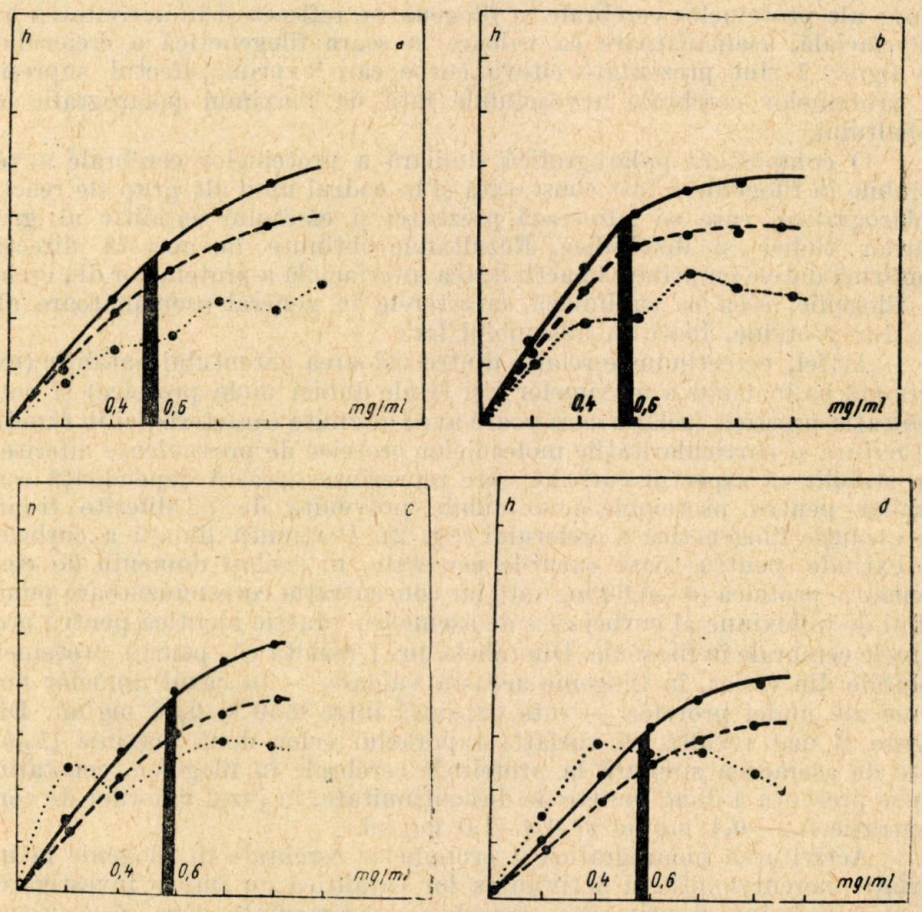


Fig. 2. — Relația dintre concentrația proteinelor solubile și valoarea undei catalitice la :

a) Creier mamifer (bou).
b) Creier mamifer (șobolan).
c) Creier reptilă.
d) Creier pește.
— linia plină = maximul al II-lea polarografic;
— linia întreruptă = maximul I polarografic;
— linia punctată = raportul h_2/h_1 ;
— porțiunea înnegrită = punctul de inflexiune.

suprafața moleculei a noi grupări polarografic active. Comportarea proteinelor serice normale la denaturarea alcalină este determinată de prezența celor două grupe principale de tipuri de proteine, diferite ca natură,

respectiv de raportul albumină/globuline [8], [9]. Albumina este afectată mai ușor și se denaturează mult mai puternic decît globulinele, ceea ce are ca urmare mărirea activității polarografice; globulinele dovedesc în schimb o „inerție" mare la denaturarea alcalină.

Tabela nr. 1

Valorile concentrației-limită a proteinelor cerebrale solubile pentru maximele polarografice II (h_2) și I(h_1) ale undei proteice, precum și a punctelor de discontinuitate ale raportului h_2/h_1

Proveniența probei	Maximul II (h_2) mg/ml	Maximul I (h_1) mg/ml	Raportul (h_2/h_1) mg/ml
Creier bou	0,54—0,58	0,50—0,58	0,4; 0,8
Creier șobolan	0,56—0,58	0,52—0,56	0,4; 0,8
Creier porumbel	0,56—0,58	0,56—0,58	0,2; 1,0
Creier reptilă	0,52—0,58	0,52—0,58	0,2; 0,8
Creier amfibie	0,56—0,58	0,54—0,58	0,2; 1,0
Creier pește	0,54—0,58	0,54—0,58	0,4; 0,8

În cazul proteinelor cerebrale se constată însă că evoluția procesului de denaturare alcalină este diferită, ceea ce presupune o natură apropiată, dacă nu chiar asemănătoare a majorității tipurilor de proteine componente, determinînd o aceeași comportare a lor la denaturare. Aceste proteine prezintă o „inerție" mare la denaturarea alcalină, comparabilă cu a globulinelor serice. Procesul de denaturare în timp a proteinelor cerebrale se petrece în două faze: una inițială, în decursul primelor 10—20 min, caracterizată prin lipsă de activare sau printr-o foarte slabă activare (fig. 3), urmată de o fază de „declin", mai rapidă pînă la aprox. 40 min și ulterior mai lentă, caracterizată prin scăderea undei polarografice proteice și, în special, a maximului II, care se apropie de valoarea maximului I. Inerția la denaturarea chimică a proteinelor cerebrale în filogenie se deduce nu numai din scăderea lentă în timp a undei catalitice, din lipsa de activare, dar și din faptul că, după aproximativ 20 de ore de contact între agentul denaturant și proteine, unda catalitică se reduce abia aproape la jumătate din valoarea sa inițială.

Se poate presupune deci că, datorită naturii proteinelor cerebrale acvosolubile, agentul denaturant n-ar acționa la nivelul structurii terțiare în sensul deplierii moleculelor și al eliberării la suprafața lor a grupărilor polarografic active; în cazul acestor proteine, denaturarea chimică ar acționa în sensul blocării sau al mascării grupărilor polarografic active, prin modificarea configurației spațiale sau, în timp, scindînd aceste molecule.

În legătură cu fenomenele descrise, privind denaturarea proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie, am considerat necesară investigarea acestor proteine și pe o altă cale, care prezintă puncte de tangență cu denaturarea, și anume degradarea enzimatică.

Rezultatele obținute prin aplicarea acestui procedeu dovedesc că proteinele solubile de creier (bou) se comportă la hidroliza enzimatică (triptică) în același mod ca la denaturarea alcalină. În linii mari, evo-

luția hidrolizei enzimatice în timp a proteinelor cerebrale solubile (fig. 4) amintește evoluția procesului de denaturare alcalină. Se constată astfel că nici în cazul hidrolizei triptice nu se produce o activare evidentă din punct de vedere polarografic a moleculelor proteice; curba hidrolizei în

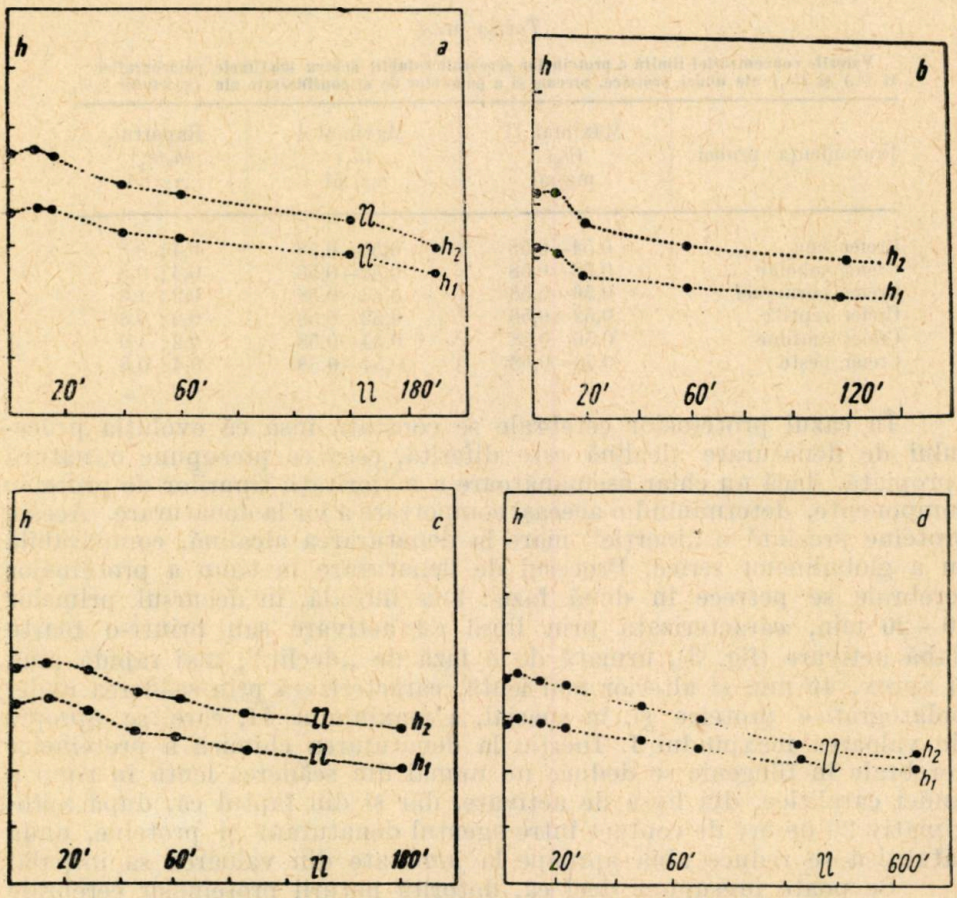


Fig. 3. — Denaturarea alcalină a proteinelor solubile din :
a) Creier mamifer (șobolan).
b) Creier reptilă.
c) Creier amfibie.
d) Creier pește.
h_2 = maximul al II-lea polarografic;
h_1 = maximul I polarografic.

timp indică și faptul că într-o etapă inițială (2—3 ore) are loc o hidroliză rapidă a proteinelor, urmată de o altă etapă în care procesul hidrolitic decurge lent. Abia după aproximativ 30 de ore de hidroliză înălțimea undei polarografice proteice se apropie de jumătatea valorii sale inițiale. O dată cu gradul de hidroliză se constată și tendința de contopire a celor

două maxime ale undei proteice; după aproximativ 50 de ore de contact între enzimă și substrat, maximul al II-lea se estompează, ceea ce indică modificări profunde la nivelul structurii moleculare (fig. 5).

În fine, în ansamblul rezultatelor obținute în domeniul polarosrafiei proteinelor cerebrale se înscriu și unele date cu privire la reacția polarografică a „filtratului" (supernatantului) proteic. S-a pus în evidență că această reacție este pozitivă pentru proteinele cerebrale solubile, provenite de pe diferite trepte de evoluție filogenetică a creierului. Concentrația substanțelor polarografic active din mediul deproteinizat este destul de mică, fapt reflectat de înălțimea undelor polarografice. Capacitatea „filtratelor" obținute după deproteinizarea proteinelor cerebrale cu acid sulfosalicilic de a da unde catalitice demonstrează că acestea conțin anumiți compuși — în special de natură mucoprotidică — similari, în primă aproximație, cu cei din „filtratul" serului deproteinizat [10], [11], [12]. Prezența în „filtratele" proteinelor cerebrale a unor compuși de acest tip a fost indicată prin reacția pozitivă obținută după pipetarea acestor soluții pe hîrtie Whatman și colorarea spoturilor cu albastru de toluidină (după oxidările prealabile). Menționăm de asemenea că compușii sulfosalicilosolubili ai proteinelor cerebrale acvosolubile precipită cu acidul fosfotungstic, precipitat solubil în mediu amoniacal.

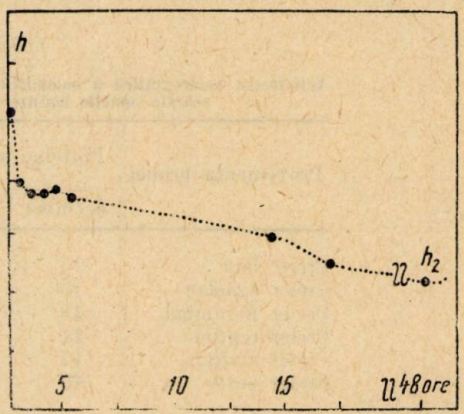


Fig.4. — Hidroliza triptică a proteinelor solubile din creierul de bou.
h_2 = maximul al II-lea polarografic.

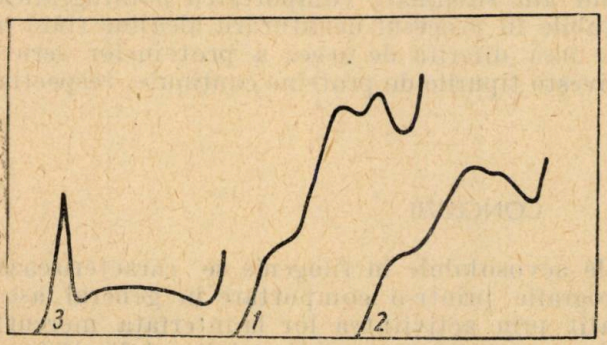


Fig. 5. — Aspectul undelor polarografice ale proteinelor solubile din creierul de bou la diferite grade de hidroliză enzimatică.
1. Unda proteică după 2 ore de hidroliză enzimatică.
2. Unda proteică după 48 de ore de hidroliză enzimatică.
3. Unda enzimei (tripsină).

Denaturarea alcalină nu indică modificări în aspectul undelor polarografice și nici diferențe semnificative în concentrația compușilor sulfosalicilosolubili ai proteinelor cerebrale, deși se constată totuși o

uşoară scădere a activităţii polarografice, comparativ cu aceea a „filtratelor" provenite din proteinele nedenaturate (tabela nr. 2).

Comparînd activitatea polarografică a „filtratelor" proteinelor cerebrale în filogenie înainte şi după denaturare cu aceea a „filtratelor" proteinelor serice normale (12), se observă un anumit paralelism.

Tabela nr. 2

Activitatea polarografică a compuşilor sulfosalicilosolubili din proteinele cerebrale solubile înainte şi după denaturare alcalină

Proveniența probei	Proteine nedenaturate		Proteine denaturate	
	h_1 (mm)	h_2 (mm)	h_1 (mm)	h_2 (mm)
Creier bou	15	24	11	19
Creier şobolan	10	14	9	13
Creier porumbel	15	18	10	14
Creier reptilă	11	19	11	19
Creier amfibie	17	24	14	20
Creier peşte	13	17	11	14

în sensul că în ambele cazuri denaturarea induce o scădere mai mult sau mai puţin pronunţată a curentului catalitic, şi nicidecum o mărire a acestuia. Considerăm că acest fapt reprezintă, alături de celelalte menţionate, un argument suplimentar care pledează în favoarea existenţei unui ansamblu de compuşi sulfosalicilosolubili de aceeaşi natură atît în cazul proteinelor cerebrale cît şi în cazul proteinelor serice normale. Cu toate acestea, după cum am subliniat, comportarea polarografică a proteinelor cerebrale solubile în procesul denaturării alcaline (fără o precipitare ulterioară) este însă diferită de aceea a proteinelor serice normale, diferenţă, care priveşte tipurile de proteine conţinute, respectiv natura acestora.

CONCLUZII

1. Proteinele cerebrale acvosolubile în filogenie se caracterizează pin punct de vedere polarografic printr-o comportare în general asemănătoare, demonstrată atît prin activitatea lor la interfaţa mercur/soluţie cît şi prin activitatea catalitică a grupărilor tiolice şi disulfidice.

2. Cercetările polarografice efectuate în diferite variante experimentale au adus date noi cu privire la natura proteinelor cerebrale, indicînd că această natură este asemănătoare în scara filogenetică a creierului. Marea majoritate a tipurilor de proteine care compun ansamblul proteinelor cerebrale extractibile în soluţii saline apoase prezintă, prin comportarea lor polarografică, un anumit paralelism cu proteinele serice normale de natură globulinică.

3. Datele polarografice confirmă şi completează rezultatele semnalate de noi anterior cu privire la solubilitatea salină a tipurilor de pro-

teine cerebrale în filogenie, la fracționarea lor pe cale chimică, precum și la unele aspecte ale analizei electroforetice.

4. „Filtratele" proteinelor cerebrale acvosolubile sînt active polarografic, prezentînd în filogenie o activitate similară. Aceste „filtrate" reprezintă un ansamblu de compuși sulfosalicilosolubili, în care se identifică compuși de natură mucoprotidică asemănători cu cei semnalați în cazul proteinelor serice normale.

5. Din generalizarea datelor obținute pe cale polarografică reiese unitatea proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie (cel puțin din cazurile cercetate). Se confirmă astfel, paralel cu eterogenitatea diferită a acestor proteine ca expresie a evoluției filogenetice, existența unui fond comun în cadrul acestei evoluții, fapt dovedit și prin alte metode experimentale, care s-au adresat unui alt ansamblu de proprietăți ale proteinelor cerebrale acvosolubile.

Prezentată la redacție
la 18 februarie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R.

BIBLIOGRAFIE

1. M. Șerban, St. cerc. biochimie, *3*, 309 (1959).
2. M. Șerban, St. cerc. biochimie, *1*, 103 (1961).
3. M. Șerban, St. cerc. biochimie, *3*, 383 (1963).
4. D. Cotariu St. cerc. biochimie, *2*, 263 (1962).
5. M. Brzina, P. Zuman, *Die Polarographie in der Medizin, Biochemie und Pharmazie*, Leipzig, 552 (1956).
6. R. Brdicka, Research, *1*, 25 (1947).
7. T. Sasai, Bul. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., **21**, 26 (1950).
8. T. Sasai, M. Egawa, Bull. Inst. Chem. Res., Kyoto Univ., **24**, 48 (1951).
9. O. H. Muller, în *Electrochemistry in Biology and Medicine*, New York, **I**, 301 (1955).
10. V. Kalous, Coll. Czech. Chem. Commun., *21*, 1236 (1956).
11. T. Sasai, Rev. Polarography, *5*, 1 (1957).
12. M. Jayle, J. Serpicelli, L. Robert, Clin. Chim. Acta, *1*, 452 (1956).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 279–284 BUCUREȘTI, IUNIE 1964

ACȚIUNEA PARATIONULUI ASUPRA FOSFORULUI TOTAL, SUBSTANȚELOR REDUCĂTOARE ȘI CONSUMULUI DE OXIGEN DIN SEMINȚELE, FRUNZELE ȘI RĂDĂCINILE SFECLEI DE ZAHĂR

DE

ADELA ȘTEFAN

Rezumat. — S-a cercetat acțiunea pe care unele tratamente cu paration o exercită asupra unor procese biochimice din sfecla de zahăr (soiurile Bod și Lovrin).

Rezultatele obținute au arătat că se produce creșterea fosforului în semințe, frunze și rădăcini și scăderea cantității de substanțe reducătoare din frunzele plantelor.

Acest tratament nu influențează în mod sensibil consumul de oxigen și nu duce la scăderea recoltei.

Numeroși autori, folosind metodele chimice de combatere a dăunătorilor sfeclei de zahăr cu preparate toxice, printre care și parationul, au obținut rezultate bune în privința evitării daunelor produse de acești dăunători [1], [2], [3], [4]. Cum cercetările efectuate de Leski și Cut [5] au arătat că insecticidele organofosforice exercită o acțiune inhibitoare asupra colinesterazei din corpul insectelor, iar Kästli [6] a constatat că insecticidele acționează negativ asupra organismelor animale, era de așteptat ca parationul să influențeze unele procese metabolice atît din semințele tratate cît și din plantele provenite din aceste semințe. De aceea în lucrarea de față am urmărit acțiunea tratamentului semințelor de sfeclă de zahăr cu paration (ekatox) asupra fosforului total, subtanțelor reducătoare și consumului de oxigen la semințele, frunzele și rădăcinile de sfeclă.

MATERIAL ȘI METODE

Experiențele au fost efectuate în primăvara anului 1962, cu două soiuri de sfeclă : Bod și Lovrin. Semințele respective au fost tratate cu emulsii de ekatox, în modul următor :

Probe de cîte 100 g semințe se introduceau în pahare Berzelius, iar în fiecare pahar se adăugau cîte 50 ml emulsie de ekatox cu concentrația de 0,01 ; 0,05 ; 0,10 ; 0,20 ; 0,40%. Ca

martor servea aceeași cantitate de semințe, cu adaos de 50 ml apă. Probele se agitau din cînd în cînd, pentru a se asigura o inbibiție uniformă, iar după 2 ore semințele erau scoase și lăsate pe hîrtie de filtru, pînă ajungeau la greutatea inițială (aproximativ 2—3 zile), apoi se semănau în cîmp, pe parcele de cîte 25 m², de patru ori. După 7 săptămîni de la răsărire, observîndu-se o invazie de afide, atît plantele tratate cît și cele martor au fost stropite cu „detox 25 emulsionabil", în concentrație de 1%.

Sfecla s-a recoltat la începutul lunii octombrie, s-au cîntărit rădăcinile și s-a dozat fosforul total. În acest scop am prelevat probe de aproximativ 25—30 g din porțiunea mijlocie a 5 rădăcini de sfeclă și le-am mărunțit, iar din amestec am luat cîte 5 probe de cîte 1 g pe care le-am mineralizat după metoda Lebedianțev [8] și în care am dozat fosforul total după metoda Bodansky, cu ajutorul colorimetrului fotoelectric FEK.

În continuare, în lunile noiembrie și decembrie 1962 am repetat cercetările în condiții de seră, tratînd semințe din soiul Bod cu aceleași concentrații de ekatox ca mai înainte, iar pentru semințele din soiul Lovrin am ales numai concentrațiile de 0,20—0,40% ekatox, care mi-au dat oarecare sporuri de recoltă. După tratament, o probă de semințe a servit pentru analize, iar o altă probă a fost însămînțată în ghivece, analizele frunzelor efectuîndu-se după 30 de zile de la răsărirea plantelor. La semințe am determinat cantitatea de fosfor total și consumul de oxigen iar la frunzele plantelor crescute din semințele tratate cu ekatox și la frunzele plantelor martor, pe lîngă fosforul total și consumul de oxigen am mai determinat și cantitatea de glucide reducătoare.

Consumul de oxigen al semințelor s-a determinat manometric, cu ajutorul aparatului Warburg. Se introduceau în fiecare vas cîte 0,5 g semințe, respectiv 1 g frunze proaspete de la plantele tratate sau martor, în corpul central 0,3 ml KOH 20% și în diverticul 0,5 ml apă distilată. Înainte de începerea determinărilor, vasele se lăsau 20 min în baie, la 20°C. Activitatea respiratorie se urmărea timp de 30 și 60 min, citirile făcîndu-se la sfîrșitul fiecărui interval. Rezultatele obținute s-au exprimat în microlitri (μl) oxigen la gram de material proaspăt și la oră.

Pentru dozarea glucidelor reducătoare în frunze am recurs la metoda Hagedorn-Jensen, modificată de Skaskin [11]. În acest scop, 1 g material proaspăt se mojara și se trecea cu 50 ml apă distilată într-un flacon Erlenmayer, apoi flaconul se ținea în baia de apă la 70°, timp de 1/2 oră. Pentru defecare s-a folosit $ZnSO_4$ 4,5% și NaOH 2%. După răcire, filtratul era adus la un volum constant și se luau probe de cîte 5 ml, în care se dozau glucidele reducătoare. Cantitatea lor se exprima în glucoză și se calcula după tabelul Hagedorn-Jensen, ținînd cont de diluția extractului.

REZULTATE

Din semințele tratate cu emulsie de paration, plantele au răsărit cu 2—3 zile mai tîrziu decît din semințele martor. Fenomenul poate fi explicat prin acțiunea slab toxică a acestei emulsii asupra semințelor tratate. De altfel, rezultate asemănătoare au fost obținute și de Somar C.

Brown și colab. [7], care au experimentat cu semințe de bumbac tratate cu paration. După răsărire, plantele de sfeclă rezultate din semințele tratate s-au dezvoltat la fel ca și plantele martor. Sfecla recoltată s-a

Tabela nr. 1

Cantitatea de sfeclă recoltată (kg/100 m²)

Ekatox 20 (conc. %)	Bod		Lovrin	
	Recoltat	Plus față de martor	Recoltat	Plus față de martor
0,01	100	15	70	2,00
0,05	102	17	68	—
0,10	92	7	72	4,00
0,20	88	3	88	20,0
0,40	106	21	88	20,0
Martor	85	—	68	—

cîntărit, iar rezultatele sînt date în tabela nr. 1. Se constată că tratamentul semințelor cu emulsie toxică de ekatox nu a micșorat recolta.

Tabela nr. 2

Cantitatea de fosfor (mg P la 100 g material uscat) din rădăcinile plantelor de sfeclă, soiul Bod și Lovrin, provenite din semințe tratate cu ekatox, precum și din semințe tratate numai cu apă (martor)

Ekatox 20 (conc. %)	Bod	Lovrin
	mg P	mg P
0,01	3,30	1,85
0,05	2,24	2,43
0,10	2,07	3,21
0,20	2,83	2,41
0,40	1,77	3,38
Martor	1,97	1,89

Determinînd cantitățile de fosfor din rădăcini, s-au obținut rezultatele menționate în tabela nr. 2.

Din analiza acestor rezultate se constată că tratamentul semințelor cu soluție de ekatox produce o creștere a procentului de fosfor din rădăcinile celor două soiuri de sfeclă. Această creștere față de martor merge pînă la 1,3 mg P% la soiul Bod, respectiv 1,5 mg P% la soiul Lovrin.

Trecînd acum la rezultatele obținute pe semințele și frunzele plantelor de sfeclă în experiențele din noiembrie-decembrie 1962, se constată că atît în semințe, cît și în frunzele plantelor tratate, cantitatea de fosfor total este în general mai mare decît la martor (tabela nr. 3). Rezultă că tratamentul semințelor cu emulsia de ekatox favorizează acumularea fosforului atît în semințe, cît și în plante.

Consumul de oxigen (tabela nr. 4) la semințele din soiurile Bod și Lovrin, atît tratate cu ekatox cît și netratate, nu prezintă deosebiri semnificative. La fel se prezintă situația și la frunzele celor două soiuri de plante.

Tabela nr. 3

Cantitatea de fosfor (mg la 100 g material proaspăt) din semințe de sfeclă, soiul Bod și Lovrin, tratate cu ekatox 20, precum și din frunzele plantelor provenite din aceste semințe

Soiul	Ekatox 20 (conc. %)	mg P în semințe	mg P în frunze
Bod	0,01	12,2	1,18
	0,10	14,0	0,78
	0,20	20,0	1,52
	0,40	22,4	1,64
	Martor	12,6	0,78
Lovrin	0,20	6,60	1,10
	0,40	17,2	1,60
	Martor	5,00	1,00

Tabela nr. 4

Consumul de oxigen ($\mu l\ O_2/g/h$) la semințele tratate cu ekatox și martor de sfeclă din soiurile Bod și Lovrin, precum și la frunzele plantelor provenite din aceste semințe

Soiul de sfeclă	Ekatox 20 (conc. %)	Resp. în minute	Semințe	Plante
Bod	0,01	30	0,027	0,100
		60	0,016	0,137
	0,05	30	0,028	0,119
		60	0,030	0,159
	0,10	30	0,020	0,111
		60	0,023	0,118
	0,20	30	0,027	0,242
		60	0,023	0,117
	Martor	30	0,015	0,084
		60	0,016	0,101
Lovrin	0,20	30	0,012	0,140
		60	0,025	0,167
	0,40	30	0,019	0,116
		60	0,011	0,108
	Martor	30	0,029	0,122
		60	0,034	0,140

Aceste rezultate se deosebesc oarecum de cele obținute de Lichtenstein, Millington și Cowley [10] care, cercetînd intensitatea procesului respirator la frunzele de porumb tratat cu paration, au constatat o intensificare a acestui proces.

În fine, se constată că ekatoxul produce în general o scădere a cantității de glucide reducătoare din frunze, atît la soiul Bod cît și la soiul Lovrin (tabela nr. 5). Această scădere este mai pronunțată la frunzele soiului Lovrin decît la acelea ale soiului Bod.

Tabela nr. 5

Cantitatea de substanțe reducătoare din frunzele de sfeclă, soiurile Bod și Lovrin (glucoză % în materialul proaspăt)

Soiul de sfeclă	Ekatox 20 (conc. %)	Glucoză
Bod	0,01	3,00
	0,05	3,00
	0,10	3,00
	0,20	4,00
	Martor	4,00
Lovrin	0,20	1,12
	0,40	2,50
	Martor	4,00

CONCLUZII

Din datele obținute rezultă că ekatoxul acționează atît asupra semințelor cît și asupra plantelor de sfeclă de zahăr provenite din semințele tratate. Tratarea semințelor de sfeclă de zahăr (soiurile Bod și Lovrin) cu emulsie de ekatox 20%, în concentrații diferite, duce la creșterea cantității de fosfor din semințe, frunze și rădăcini, atît la soiul Lovrin cît și la soiul Bod, și la scăderea cantității de substanțe reducătoare din frunzele plantelor respective.

Acest tratament nu influențează în mod sensibil consumul de oxigen nici la semințele ambelor soiuri de sfeclă, nici la frunzele lor.

În fine, tratarea semințelor de sfeclă de zahăr cu emulsie de ekatox nu duce la scăderea recoltei, deși substanța este toxică pentru insecte.

Prezentată la redacție
la 30 august 1963

Catedra de biochimie,
Facultatea de științe naturale,
Universitatea București

BIBLIOGRAFIE

1. Florica Manolache, A. Racovită, Vera Bontea, C. Beratlief, *Cercetări întreprinse în R.P.R. cu privire la bolile și dăunătorii sfeclei de zahăr. Probleme actuale ale culturii sfeclei de zahăr*, Edit. Acad. R.P.R., 1960.
2. T. E. Izotopa, *K voprosu o haracteristike svoistv insektițidov proizvodnîh ot oktametila.* Akad. Nauk SSSR, 1957, Referativnîi jurnal biologhiia, 7, 226, ref. 30 585 (1958).
3. V. P. Vasiliev, E. N. Kititin, *Efektivnosti fosfamida.* Zaşcita rastenii ot vreditelei i boleznei, 5, 34—35 (1962).
4. Florica Manolache, *Principalii dăunători ai sfeclei și măsurile de combatere*, Acad. R. P. R., Anal. rom.-sov., Seria agrobiologie, 2/3 (1959).

5. R. A. Leski, L. K. Cut, *The influence of Parathion and Paraoxan on sory Hairs of Flies*, J. ec. Entomol., *3*, 281—286 (1962).
6. P. Kastli, *L'influence des insecticides et des fongicides sur l'hygiène du lait*, Paris (1955).
7. Somar C. Brown, Georges W. Cathey, Charles Lincoln, *Growth and developement of cotton as affected by toxaphene DDT, Methyl Parathion and Calcium Arseniate*, J. ec. Entomol., *3* (1962).
8. A. N. Lebediantev, *Manual de lucrări practice de chimie agricolă A. V. Peterburgski*, 30—33 (1954).
9. Bodansky, J. biol. Chim., 101—193 (1933).
10. E. P. Lichtenstein, W. F. Millington, G. T. Cowley, *Effect of various insecticides on growth and respiration of plants*, J. Agric. Food Chimie, *3*, 231—256 (1962).
11. F. D. Skaskin, E. I. Lovcinovscaia, T. A. Krasnoselskaia, M. S. Miller, V. V. Anichiev, *Praktikum pofiziologhii rastenii*, Sov. Nauka, Moscova (1953). *Opredelenie rastvorimîh saharov metodom Hagedorn-Jensen*, p. 212—214.

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 285–294, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

ACIZII LACTIC ȘI PIRUVIC DIN MUȘCHII GASTROCNEMIENI DE BROASCĂ ÎN CONTRACȚIA IZOTONICĂ

DE

D. TĂNĂSESCU

Rezumat. — Au fost studiate în condițiile organismului întreg : *a*) acumularea acidului lactic în mușchii gastrocnemieni de broască, în funcție de numărul de contracții efectuate și după diferite intervale de timp de la încetarea ultimei contracții ; *b*) nivelul acizilor lactic și piruvic din mușchii denervați în urma efectuării unor serii de 25 și 50 de contracții.

Se constată o creștere bruscă a concentrației acidului lactic — față de valorile normale ale mușchilor în repaus — după efectuarea primelor contracții. Acest fapt dovedește o relație strînsă, inițială, între procesele contractile și glicoliză.

S-a observat de asemenea că nu există un raport liniar între numărul de contracții și acumularea acizilor lactic și piruvic.

Determinările de acid piruvic au arătat un strîns paralelism, în cadrul tuturor variantelor experimentale descrise în această notă, în ceea ce privește variația acestui acid cu acela a acidului lactic în cursul contracției musculare. Acest fapt dovedește o strînsă legătură între metabolismul anaerob și cel aerob al mușchilor în contracție.

Lucrările lui Lundsgaard [1], Meyerhof [2] și Lohmann [3], efectuate pe mușchi izolați, împreună cu cele mai recente, făcute pe fibre glicerinate de către Szent-Györgyi [4], Weber [5], au pus bazele teoriei clasice a contracției musculare, potrivit căreia ATP-ul și creatinfosfatul sînt sursele principale de energie necesară acestor procese.

În ultimii ani însă, cercetarea biochimismului contracției musculare a intrat într-o etapă nouă, datorită lucrărilor lui Flekenstein și colab. [6], Mommaerts [7] și Chance și colab. [8], care au arătat — contrar teoriei clasice — că, în cursul unor tetanosuri scurte sau în contracții singulare nu se observă o scindare a ATP-ului și a creatinfosfatului.

Au fost deci necesare cercetări care să lămurească fără echivoc, care sînt și cum decurg procesele energetice care stau la baza contracției musculare, mai ales că, așa cum au arătat și Mommaerts și colab. [9], în 1962, activitatea contractilă a mușchilor și relațiile acesteia cu reacțiile endergonice s-au bazat pînă acum numai pe măsurători de căldură, baza chimică a acestor reacții fiind incomplet cercetată. Deci numai o demonstrare directă a succesiunii reacțiilor chimice și a corespondenței lor

cantitative față de energia eliberată va putea lămuri natura legăturilor mecano-chimice care au loc în mușchiul în contracție.

Lucrările recente ale lui Mommaerts și colab. [10], Davies, Cain și Infante [11], [12], Carlson și Siger [13] și ale altor cercetători [14], [15] care au urmărit de pe această poziție reacțiile chimice care au loc în mușchi au lămurit rolul jucat de către ATP și de creatinfosfat în aceste procese.

Cu toate acestea [16], [17], nici una dintre lucrările din ultimii ani nu abordează studiul relațiilor dintre procesele contractile ale mușchilor, resinteza compușilor macroergici consumați și procesele glicolitice.

De aceea, pentru a lămuri rolul jucat în reacțiile endergonice ale mușchilor de către acidul lactic, ca produs final al proceselor glicolitice, și de către acidul piruvic prin care se face legătura cu lanțul proceselor oxidative ne-am propus să urmărim acumularea acestor acizi în mușchii gastrocnemieni de broască, după efectuarea unor serii de contracții izotonice.

MATERIAL ȘI METODE

Partea metodologică. S-a lucrat la temperatura camerei, pe mușchi gastrocnemieni de broaște (*Rana ridibunda*) capturate în jurul orașului București, animalele avînd o greutate medie de 45 g.

Pentru cercetarea acizilor lactic și piruvic în condiții cît mai apropiate de cele *in vivo* s-a folosit tehnica utilizată de către Macovschi, Iordache și Dragomirescu [18].

În acest scop, broasca, fără a i se distruge axul cerebrospinal, a fost imobilizată cu ajutorul unor elastice pe o placă de plexiglas, piciorul stîng fiind legat de placă pentru a se evita orice mișcare în cursul experienței, pe cînd cel drept era lăsat liber. Pe piciorul drept, la cele două extremități ale mușchiului gastrocnemian, s-au aplicat doi electrozi de argint, clorurați, și s-au făcut stimulări electrice cu curent de diferite intensități. Piciorul stîng, neexcitat, a fost considerat drept martor, cu toate că în urma stimulărilor s-a observat și în acest mușchi — deși mușchii nu se contractau — o creștere a acizilor lactic și piruvic, după cum se va vedea la capitolul „Rezultate și discuții".

Valorile fiziologic normale s-au determinat în mușchii gastrocnemieni ai broaștelor în repaus.

După efectuarea numărului dorit de contracții, s-au tăiat simultan și rapid ambele picioare și s-au înghețat aruncîndu-le într-un vas cu aer lichid. Această ultimă operație s-a realizat în numai 2—3 s. După desfacerea pielii, s-au scos mușchii gastrocnemieni și s-au mojarat, adăugîndu-se în cursul mojarării aer lichid, pentru a se evita dezghețarea.

Praful de mușchi, după îndepărtarea minuțioasă a țesutului conjunctiv, s-a introdus într-un pahar Berzellius, tarat în prealabil, și s-au cîntărit rapid între 0,4 și 0,6 g. Peste praful de mușchi înghețat s-au pipetat 7 ml de acid tricloracetic 10% răcit, apoi totul s-a trecut cantitativ într-un omogenizator de sticlă tip Potter și s-a omogenizat la 2 000 ture/min, timp de 30 s.

În cazul experiențelor efectuate pe mușchi denervați, s-a secționat nervul sciatic, s-a cusut pielea, iar broaștele astfel operate s-au păstrat la temperatura camerei timp de 20—24 de ore, după care au fost luate în experiență.

Metodele analitice. Extractul tricloracetic a fost centrifugat la 4 500 ture/min, timp de 15 min.

Pentru dozarea acidului lactic, efectuată după metoda lui Barker şi Summerson [19], modificată de Hulkin şi Noble [20], s-a luat 1 ml supernatant.

Pentru determinarea acidului piruvic, făcută după metoda lui Friedeman şi Haugen [21], modificată de Saks şi colab. [22], s-au folosit 5 ml extract tricloracetic. Extracţiile cu xilen şi cu carbonat de sodiu s-au făcut prin agitare mecanică timp de 3 min, faza de carbonat de sodiu fiind apoi centrifugată timp de 15 min, la 3 000 ture/min. Dezvoltarea culorii s-a realizat cu NaOH 4%, citirile efectuîndu-se după 15 min, la 470 mμ. Valorile au fost raportate faţă de o curbă de referinţă cu piruvat de sodiu, făcută în aceleaşi condiţii ca proba.

Dozarea acidului piruvic s-a executat după 24 de ore de la prepararea extractului, soluţia tricloracetică păstrîndu-se la temperatura de 4°C, pentru a se evita interferenţa cu acidul oxalacetic [21].

Aparatura. Pentru efectuarea stimulărilor electrice s-au folosit următoarele tipuri de generatoare de impulsuri :

a) Cronaximetrul TuR R.S.3 (R.D.G.), care realiza un tren de 38 de impulsuri rectangulare pe min, lucrîndu-se la o intensitate de curent de 2 mA.

b) Polystat (R.P.B.) la care s-a lucrat cu 2 impulsuri pe secundă, intensitatea de curent, fiind 2 mA, durata excitaţiei 2 ms, iar durata pauzei între 2 contracţii a fost 499 ms.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

După cum am arătat în partea introductivă a lucrării, pînă în prezent modul în care decurg procesele glicolitice care au loc în cursul unor serii scurte de contracţii nu a fost precizat suficient de clar. Aşadar, studiul glicolizei, făcut fie prin cercetarea enzimelor care participă la aceste reacţii, fie prin aceea a compuşilor fosforici care iau parte la aceste procese, fie, în sfîrşit, prin aceea a termenilor finali ai glicolizei — acidul lactic şi acidul piruvic —, poate dezvălui aspecte interesante ale reacţiilor endergonice care au loc în muşchiul în contracţie.

În nota de faţă sînt arătate datele obţinute în două variante experimentale, şi anume :

1) Acumularea acidului lactic în funcţie de numărul de contracţii efectuate, urmărită după diferite intervale de timp de la încetarea ultimei contracţii ;

2) Acumularea acizilor lactic şi piruvic după un anumit număr de contracţii efectuate de muşchii denervaţi, stimulaţi electric.

În cadrul primei variante experimentale, folosind cronaximetrul TuR R.S.3, au fost cercetate două aspecte, şi anume :

a) gradul de acumulare a acidului lactic în urma efectuării a 25, 50, respectiv 100 de contracţii izotonice ;

b) nivelul acidului lactic la îngheţarea muşchiului fie imediat, fie după 5 sau 10 minute de la terminarea seriilor de 25, 50 şi 100 de contracţii.

În cazul îngheţării muşchilor imediat după terminarea unei serii de 25 de contracţii izotonice se remarcă o creştere bruscă a acidului lactic faţă de nivelul fiziologic normal, determinat la broaştele în repaus (tabela nr. 1).

Prin efectuarea a 50 de contracţii, acumularea acidului lactic creşte, însă cu o raţie în mod evident mult mai mică decît în cazul efectuării a

25 de contracții, fapt care se menține și în cazul seriilor de 100 de contracții, unde valorile sînt mai mici și față de cele determinate după 50 de contracții (tabela nr. 2).

Prin înghețarea mușchilor după 5 minute de la terminarea seriilor de 25, 50, respectiv 100 de contracții, se pot face aceleași observații ca mai sus, cu deosebirea însă că, în toate seriile de contracții efectuate valorile sînt mai mari decît cele obținute prin înghețarea imediată.

Tabela nr. 1

Acumularea acidului lactic în mușchii gastrocnemieni de broască în funcție de numărul de contracții și urmărită după diferite intervale de timp de la încetarea ultimei contracții. Curentul electric a fost furnizat de către cronaximetrul TuR R.S. 3, care realiza un tren de 38 impulsuri rectangulare pe min. Intensitatea curentului, 2 mA.
Datele reprezintă media a 10 determinări. Valoarea acidului lactic din mușchii în repaus a fost de 4,77±0,45 mg%.
E = mușchiul excitat C = mușchiul de control neexcitat

		Înghețare imediat după ultima contracție (mg %)	Înghețare după 5 minute (mg %)	Înghețare după 10 minute (mg %)
25 contracții	E	20,66±1,30	23,85±0,98	6,67±0,21
	C	15,79±1,45	19,87±1,02	12,63±0,30
50 contracții	E	24,05±1,15	27,00±1,09	11,55±0,72
	C	18,78±1,12	23,18±1,12	16,59±0,85
100 contracții	E	28,64±1,95	30,58±1,30	13,12±0,48
	C	22,16±1,86	26,09±1,73	18,78±0,62

Această observație confirmă lucrările clasice ale lui Lehnartz [23] și Meyerhof [2], care au arătat că producția de acid lactic are o valoare maximă după 5 minute de la încetarea contracției musculare, ceea ce se explică prin necesitatea resintetizării pe cale glicolitică, în mușchiul relaxat, a compușilor macroergici consumați.

Tabela nr. 2

Gradul de acumulare a acidului lactic în mușchii gastrocnemieni de broască în urma efectuării unor serii de 25, 50, respectiv 100 de contracții. Curentul electric a fost furnizat de către cronaximetrul TuR R.S.3, care realiza un tren de 38 de impulsuri rectangulare pe min. Intensitatea curentului, 2 mA. Datele reprezintă media a 10 determinări.
Au fost trecute numai valorile obținute cu mușchiul excitat

	25 contracții μg/g/contracție	50 contracții μg/g/contracție	100 contracții μg/g/contracție
Înghețare imediat după ultima contracție	6,35±0,03	3,86±0,02	2,38±0,02
Înghețare după 5 minute	7,23±0,03	4,45±0,02	2,58±0,02
Înghețare după 10 minute	0,007±0,001	1,35±0,02	0,83±0,05

Înghețînd mușchii după 10 minute de la terminarea contracțiilor, nu se mai reproduc rezultatele obținute după înghețarea imediată sau după 5 minute; valorile au un nivel doar puțin mai ridicat față de cel

observat în cazul animalelor în repaus, şi acest fapt apare mai pregnant în special după efectuarea seriilor de 25 de contracţii.

Aceste rezultate arată că procesele glicolitice care au loc în cadrul contracţiei musculare — exprimate prin creşterea acidului lactic — sînt declanşate imediat după începerea primelor contracţii, fapt care nu a fost scos în evidenţă pînă acum. Această observaţie ne permite să afirmăm că există o strînsă dependenţă între primele reacţii energetice care au loc în muşchi în cursul contracţiei acestora şi procesele glicolitice. Dacă acidul lactic care se acumulează în urma efortului depus provine iniţial din fosforoliza glicogenului sau din produşii intermediari ai lanţului glicolitic, preexistenţi în muşchii care se găsesc în repaus, rămîne să se lămurească în cursul următoarelor noastre lucrări.

Se observă, de asemenea, (tabela nr. 2), că acumularea acidului lactic nu creşte proporţional cu numărul contracţiilor efectuate de muşchi. Este interesant de subliniat că în timp ce în muşchii izolaţi, otrăviţi cu acid monoiodacetic, descompunerea creatinfosfatului are loc liniar, proporţional cu numărul de contracţii efectuate de către muşchi [13], în muşchii *in situ* [24] se constatată o lipsă de liniaritate similară cu cea constată de noi în cazul acidului lactic.

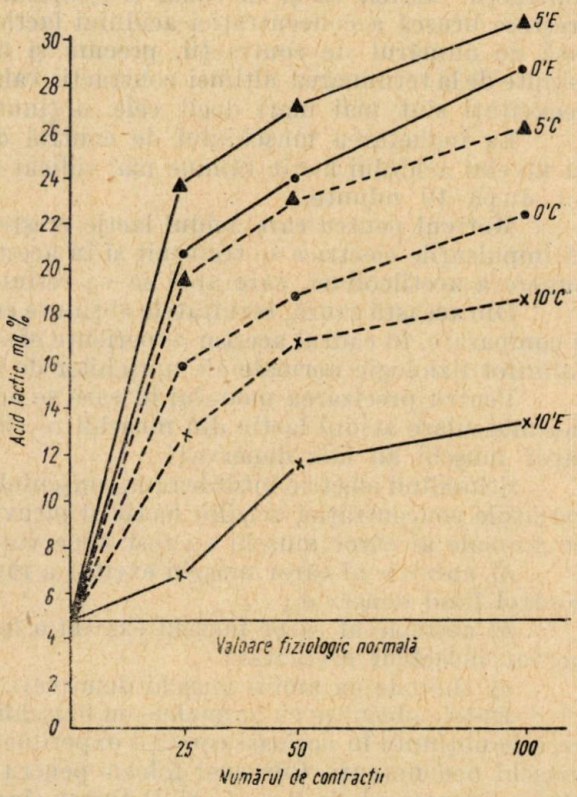


Fig.1. — Nivelul acidului lactic în muşchii gastrocnemieni de broască după efectuarea unor serii de 25,50, respectiv 100 de contracţii.

●–●–● = Muşchi excitaţi şi îngheţaţi imediat după terminarea ultimei contracţii (0′ E).

▲–▲–▲ = Muşchi excitaţi şi îngheţaţi după 5 minute de la terminarea ultimei contracţii (5′ E).

×–×–× = Muşchi excitaţi şi îngheţaţi după 10 minute de la terminarea ultimei contracţii (10′ E).

Liniile punctate ●...●...● (0′ C); ▲...▲...▲ (5′C); ×...×...× (10′C) reprezintă muşchii pereche, neexcitaţi, îngheţaţi imediat, după 5 şi după 10 minute de la terminarea ultimei contracţii.

Cu ajutorul metodei de cercetare utilizate, care ne-a permis studiul în condiţiile organismului întreg, am putut urmări modificările concentraţiei acidului lactic atît în muşchiul excitat cît şi în muşchiul neexcitat. Din datele trecute în tabela nr. 1 şi din figura 1 se vede însă că şi în muş-

chiul neexcitat are loc o acumulare de acid lactic, care, deşi cu valori mai mici, merge paralel cu aceea observată în muşchiul excitat şi îngheţat, imediat sau după 5 minute de la terminarea seriilor de 25, 50 şi 100 de contracţii. Astfel, ca şi în cazul muşchiului excitat, se observă aceeaşi creştere bruscă a concentraţiei acidului lactic, aceeaşi lipsă de liniaritate faţă de numărul de contracţii, precum şi faptul că, îngheţînd după 5 minute de la terminarea ultimei contracţii valorile determinate pe muşchii neexcitaţi sînt mai mari decît cele obţinute prin îngeţarea imediată.

La îngheţarea muşchiului de control după 10 minute, se observă că nivelul acidului lactic rămîne mai ridicat decît la cel excitat, îngheţat tot după 10 minute.

Motivul pentru care acidul lactic creşte şi în piciorul neexcitat este că impulsurile electrice se transmit şi în acest picior, se produce o descompunere a acetilcolinei, care apoi se va resintetiza prin glicoliză [24].

Din această cauză, rezultatele obţinute cu muşchii excitaţi n-au putut fi comparate, în cadrul acestor experienţe efectuate *in vivo*, decît cu media valorilor fiziologic normale ale muşchilor de broască în repaus.

Pentru precizarea modului în care se acumulează în cursul contracţiei musculare acidul lactic din muşchii *in situ* s-a lucrat şi pe animale ai căror muşchi au fost denervaţi.

Stimulînd electric întotdeauna muşchiul piciorului drept, am urmărit variaţiile concentraţiei acizilor lactic şi piruvic în ambii muşchi, pe loturi de animale ai căror muşchi au fost denervaţi, după cum urmează:

a) animale al căror muşchi excitat a rămas nedenervat, muşchiul de control fiind denervat;

b) animale al căror muşchi excitat a fost denervat, lăsîndu-se nedenervat muşchiul neexcitat;

c) animale cu ambii muşchi denervaţi.

Datele obţinute cu animalele cu muşchii denervaţi au fost comparate cu cele obţinute în aceleaşi condiţii experimentale cu animale avînd ambii muşchi nedenervaţi. Curentul folosit pentru stimulări a fost furnizat de către generatorul de impulsuri Polystat, lucrîndu-se la o intensitate de curent de 2 mA cu două impulsuri pe s, durata unui impuls fiind de 2 ms şi pauza între două contracţii de 499 ms.

Examinînd datele din tabela nr. 3, se observă un strîns paralelism între acumularea acizilor lactic şi piruvic în muşchii excitaţi ai loturilor de animale nedenervate şi aceea care a avut loc în muşchiul de control, neexcitat, denervat. Gradul de acumulare constatat după efectuarea a 25 sau, 50 de contracţii de către muşchii excitaţi ai acestor loturi de animale este aproape acelaşi. Se observă astfel, ca şi în cazul variantei descrise anterior, aceeaşi creştere bruscă a concentraţiei acidului lactic faţă de media valorilor determinate la broaştele în repaus, şi care are loc imediat după efectuarea primelor contracţii, precum şi faptul că acumularea nu este proporţională cu numărul de contracţii efectuat. Determinîndu-se acumularea de acid lactic în muşchii excitaţi ai loturilor de animale nedenervate, se constată că după 25 de contracţii are loc o creştere de 5,49 μg/g/contracţie, în timp ce după 50 de contracţii creşterea este de 3,43 μg/g/contracţie. La loturile de animale al căror muşchi control a fost dener-

Tabela nr. 3

Nivelul acizilor lactic şi piruvic în muşchii gastrocnemieni de broască denervaţi stimulaţi electric. Curentul electric a fost furnizat de către generatorul de impulsuri Polystat. S-a lucrat cu 2 impulsuri/s, intensitatea de curent 2 mA, durata excitaţiei 2 ms, iar durata pauzei dintre 2 contracţii 499 ms. Datele reprezintă media a 10 determinări.

E = muşchiul excitat C = muşchiul de control, neexcitat

		Acidul lactic (mg%)		Acidul piruvic (mg %)	
		25 contracţii	50 contracţii	25 contracţii	50 contracţii
Animale nedenervate	E	13,72±0,93	17,17±0,87	0,31±0,04	0,54±0,06
	C	8,22±0,71	10,67±0,68	0,21±0,03	0,29±0,06
Animale cu muşchiul control denervat	E	14,96±0,87	18,62±0,98	0,37±0,03	0,56±0,05
	C	5,12±0,42	6,39±0,35	0,16±0,01	0,19±0,04
Animale cu muşchiul excitat denervat	E	6,80±0,35	14,90±0,71	0,22±0,04	0,46±0,04
	C	8,75±0,42	15,32±0,52	0,28±0,03	0,54±0,05
Animale cu ambii muşchi denervaţi	E	5,57±0,38	8,01±0,37	0,18±0,02	0,22±0,02
	C	6,25±0,45	8,52±0,39	0,20±0,02	0,24±0,03
Valoarea fiziologic normală		4,77±0,42		0,15±0,02	

vat, această creştere a fost, în cazul a 25 de contracţii, de 5,98, respectiv 3,72μ g/g/contracţie în urma efectuării a 50 de contracţii. Deci se obţin raţii de creştere foarte apropiate.

Nu se poate face însă aceeaşi observaţie comparînd valorile obţinute cu muşchii control, neexcitaţi, ai celor două loturi, deoarece în lotul de animale care a avut muşchiul control denervat valoarea acidului lactic rămîne la un nivel foarte apropiat de acel al muşchilor de broască în repaus, în timp ce la cele normale creşte. Deci acumularea care are loc în muşchii neexcitaţi se face pe calea sistemului nervos şi nu pe al celui circulator.

Această constatare mai este întărită şi de faptul că la animalele care au avut ambii muşchi denervaţi valorile determinate ale acidului lactic rămîn scăzute în ambii muşchi, atît în cel excitat denervat cît şi în cel control denervat, atît după efectuarea a 25 de contracţii cît şi după efectuarea a 50 de contracţii.

Atunci cînd s-a lucrat pe animale care au avut muşchiul excitat denervat, cel de control rămînînd nedenervat, se constată un aspect curios, care va fi aprofundat într-o lucrare ulterioară; astfel, în timp ce după 25 de contracţii nivelul acidului lactic al ambilor muşchi rămîne scăzut, după 50 de contracţii se observă o acumulare similară celei constatate în cazul muşchilor excitaţi nedenervaţi.

În ceea ce priveşte variaţia care are loc în concentraţia acidului piruvic în urma contracţiei musculare, în această notă ne limităm să

constatăm că ea urmează îndeaproape valorile acidului lactic, putîndu-se face aceleaşi observaţii ca în cazul acestuia din urmă.

Raportul acid lactic/acid piruvic rămîne constant în toate variantele descrise în această lucrare, ceea ce dovedeşte relaţia strînsă care există în cadrul contracţiei musculare între metabolismul anaerob şi cel aerob. Considerăm că acest fapt trebuie să fie studiat mai îndeaproape, limitîndu-ne deci aici la semnalarea acestor sumare observaţii în ceea ce priveşte variaţia concentraţiei acidului piruvic în funcţie de numărul de contracţii executate de către muşchi.

CONCLUZII

Din rezultatele studiului efectuat asupra gradului de acumulare a acizilor lactic şi piruvic în muşchii stimulaţi electric, în condiţiile organismului întreg se pot desprinde următoarele concluzii :

a) În urma unor serii de 25 de contracţii izotonice, are loc o creştere bruscă a concentraţiei acidului lactic faţă de valorile normale ale muşchilor de broască în repaus, acest fapt dovedind că între procesele endergonice şi cele glicolitice ale muşchilor există o relaţie strînsă chiar de la primele contracţii provocate de stimulii electrici ;

b) În cazul muşchilor care au executat serii de 25, 50 şi 100 de contracţii şi au fost îngheţaţi imediat sau după 5 minute de la încetarea ultimului stimul, nu se constată un raport liniar între numărul de contracţii şi acumularea acidului lactic.

c) Se confirmă faptul că valorile acidului lactic au un maxim de concentraţie după 5 minute de la încetarea seriilor de contracţii ;

d) După 10 minute de la încetarea contracţiilor, valorile acidului lactic tind spre acelea ale muşchilor în repaus, cu excepţia celor din muşchii control, unde valorile rămîn ridicate un timp mai îndelungat ;

e) Determinările de acizi lactic şi piruvic făcute în muşchiul neexcitat arată o creştere a concentraţiei acestora, datorită transmiterii impulsului electric şi în acest muşchi ;

f) Se constată o strînsă dependenţă între acumularea acidului lactic şi aceea a acidului piruvic în cursul contracţiei musculare.

Prezentată la redacţie
la 18 februarie 1964

Institutul de biochimie al Academiei R. P. R., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. E. LUNDSGAARGD, *Untersuchungen über die Muskelkontraktion ohne Milchsäurebildung*, Bioch. Z., **227**, 71 (1930).
2. O. MEYERHOF, *Die Zeitgebunderheit der Milchsäurebildung in der Muskelkontraktion*, Klin. Woschr., **10**, 214 (1931).
3. K. LOHMANN, *Über die enzymatische Aufspaltung der Kreatinphosphorsäure ; zugleich ein Beitrag zum Chemismus der Muskelkontraktion*, Bioch. Z., **271**, 264 (1934).
4. A. SZENT-GYÖRGYI, *Free-energy relation and contraction of actomyosin*, Biol. Bull., **96**, 140 (1949).

5. A. Weber, *Muscle contraction and model contraction*, Biochim. Biophys. Acta, **7**, 214 (1951).
6. A. Flekenstein, J. Janke, R. Davies, H. Krebs, *Chemistry of muscle contraction. Contraction of muscle without fission of adenosine triphosphate on creatine phosphate*, Nature, **174**, 1 081 (1954).
7. W. F. H. M. Mommaerts, *Investigation of presumed breakdown of ATP and phosphocreatine during a single muscle twich*, Am. J. Physiol., **183**, 585 (1955).
8. B. Chance, C. M. Connelly, *A method for the estimation of the increase in concentration of adenosine diphosphate in muscle sarcosomes following a contraction*, Nature, **179**, 1 235 (1957).
9. W. F. H. M. Mommaerts, K. Seraydarian, G. Marechal, *Work and chemical change in isotonic muscular contractions*, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 1 (1962).
10. G. Marechal, W. F. H. M. Mommaerts, *The metabolism of phosphocreatine during an isometric tetanus in the frog sartorius muscle*, Biochim. Biophys. Acta, **70**, 53 (1963).
11. D. F. Cain, R. E. Davies, *Breakdown of adenosine triphosphate during a single contraction of working muscle*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **8**, 361 (1962).
12. A. A. Infante, R. E. Davies, *Adenosine triphosphate during a single isotonic twich of frog sartorius muscle*, Biochem. Biophys. Res. Comm., **9**, 410 (1962).
13. R. D. Carlson, A. Siger, *The mechanochemistry of muscular contraction. I. The isotonic twich*, J. Gen. Physiol., **44**, 33 (1950).
14. G. Maréchal, G. Bleuky, *Le métabolisme de la phosphocréatine durant une contraction isométrique*, Arch. Intern. Physiol. Bioch., **71**, 280 (1963).
15. L. B. Nanninga, *On the inhibition of myosin-ATP-ase by adenosine triphosphate*, Arch. Biochem. Biophys., **96**, 51 (1960).
16. S. V. Perry, *The biochemistry of muscle*, Ann. Rev. Biochem., **30**, 473 (1961).
17. D. M. Needham, *Biochemistry of muscular action*, în *The structure and function of muscle*, edit. G. H. Bourne, New York, Academic Press. Inc., **II**, 55 (1960).
18. E. Macovschi, C. Iordache, C. Dragomirescu, *Fosfagenul în diferite stări de activitate şi excitabilitate musculară*, St. cerc. biochimie, *4*, 171 (1961).
19. S. B. Barker, W. A. Summerson, *The colorimetric determination of lactic acid in biological material*, J. Biol. Chem., **138**, 535 (1941).
20. R. P. Hulkin, R. L. Noble, *The determination of lactic acid in microgram quantities*, Bioch. J., **55**, 289 (1953).
21. T. E. Friedeman, G. E. Haugen, *Pyruvic acid. II. The determination of keto-acids in blood and urine*, J. Biol. Chem., **147**, 415 (1943).
22. J. Sacks, R. U. Ganslen, J. T. Diffée, *Lactic and pyruvic acid relations in frog muscle*, Ann. J. Physiol., **177**, 113 (1954).
23. E. Lehnartz, *Der Gang der Milchsäurebildung bei der Muskelkontraktion*, Klin. Wschr., **10**, 27 (1931).
24. C. Iordache, *Rolul excitaţiilor şi efortului mecanic în descompunerea fosfagenului din muşchi în diferite stări de excitabilitate*, St. cerc. biochimie, *2*, 195 (1964).
25. D. Nachmansohn, *The neuromuscular junction: role of the acetylcholine system*, în *The structure and function of muscle*, sub redacţia G. H. Bourne, New York, Academic Press Inc., **II**, 199 (1960).

ST. CERC. BIOCHIMIE, TOMUL 7, NR. 2, P. 295 – 300, BUCUREȘTI, IUNIE 1964

CUPROOXIDAZA SERICĂ ÎN CURSUL UNOR AFECȚIUNI INFLAMATORII CRONICE ȘI UNOR HEMOPATII MALIGNE

DE

MARCELA ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, C. VLĂDESCU, ILEANA APOSTOLESCU, MARIANA GOCIU și C. MIRON

Rezumat. — Autorii studiază variațiile cuprooxidazei serice (ceruloplasminei) pe 167 de cazuri, dintre care 10 normali și restul cu afecțiuni cronice inflamatorii și hemopatii — în majoritate maligne.

Activitatea enzimatică este determinată prin metoda cu parafenilen-diamină (recristalizată), indicată de Ravin, rezultatele fiind apreciate în unități convenționale de extincție (fotometrul Pulfrich-Zeiss).

Pe baza acestei metode se observă creșteri pînă la de trei-patru ori valoarea normală a cuprooxidazei serice (ceruloplasminei) în 72% din cazurile de boală Hodgkin. Acest fapt ar putea constitui un element de probabilitate diagnostică diferențială între boala Hodgkin și alte limfoame maligne.

Creșterea activității ceruloplasminei este interpretată de autori ca o manifestare reactivă nespecifică a sistemului reticulo-endotelial.

Sub denumirea de ceruloplasmină este desemnată cuproproteina serică cu funcție oxidazică, care a intrat în semiologia biochimică o dată cu precizarea cadrului sindromului umoral al degenerescenței hepatolenticulare [2], [3], [8], [15], [16], cunoscută și ca boala lui Wilson. În cursul acestei boli activitatea enzimei este scăzută pînă la o valoare practic nulă, prin deficit de sinteză [2], [8]. Cercetări întreprinse din 1948 pînă în prezent dovedesc variații ale activității cuprooxidazei serice, în sensul creșterii, în diferite stări fiziologice și patologice, ca : sarcină, 3% din normali, hipertiroidism, anumite stări infecțioase (tuberculoză, pneumonie, hepatită virotică după unii autori), neoplasme, infarct miocardic în rezoluție, schizofrenie, psihoză maniacodepresivă, parkinsonism, coree Huntington, scleroză multiplă, ciroză; scăderi sînt semnalate în nefroze, prin eliminare urinară crescută [2].

Rolul fiziologic al acestei enzime nu este încă bine cunoscut. După Abderhelden [2], trebuie părăsită părerea că în plasmă ar exista, alături de ceruloplasmină, o altă cuprooxidază — benzidinoxidaza —, deși încă în 1960 autori ca Sullivan [13] continuă să cerceteze sub această denumire capacitatea oxidativă a serului față de benzidină. Ceruloplasmina oxidează *in vitro* atît benzidina, cît și parafenilendiamina, orto- și paradifenolii și acidul ascorbic. Hornykiewicz o socotește identică cu polifenoloxidaza serică [8].

Substratul fiziologic nu este încă bine identificat; s-a atribuit enzimei un rol în oxidarea catecolaminelor simpaticomimetice (adrenalină şi noradrenalină), serotoninei şi glutationului, dar ipotezele nu sînt confirmate [8]. I s-a atribuit de asemenea un rol în resorbţia intestinală a cuprului, dar s-a adus obiecţia serioasă că stabilitatea legăturii metal-proteină în acest compus ar face-o improprie îndeplinirii acestei funcţii [8].

În condiţii fiziologice există un raport strîns între cuprooxidaza serică şi nivelul cupremiei; în condiţii patologice corelaţia nu este obligatoriu păstrată. Fiziologic, 96% din cuprul sanguin este legat ca ceruloplasmină, migrînd cu alfa$_2$-globulina; cuprul de transport (4% din cupremie) este legat labil de fracţiunea albuminică [8], [9], [12].

Organul principal de sinteză, depozitare şi secreţie a enzimei este ficatul [8], [12].

Pe baza acestor date fiziopatologice, am căutat să introducem, în explorarea clinică a unor grave afecţiuni cronice inflamatorii, investigarea acestei activităţi enzimatice. Cercetarea întreprinsă de noi a plecat în special de la necesitatea de a găsi noi criterii obiective, cu aplicabilitate simplă şi precisă în diagnosticul hepatitei cronice postvirale şi al evoluţiei sale lente către ciroză. În lotul martor de comparaţie am urmărit, printre altele, cazuri de poliartrită cronică evolutivă şi unele hemopatii maligne, cu evoluţie cronică sau acută. Deşi, printre cazurile de hepatită studiate au fost unele cu sindrom inflamator net — biologic şi biopsic —, cu disproteinemie evidentă şi reacţie mezenchimală intensă, rezultatele cele mai nete, interesante ca valoare semiologică diagnostică, prin frecvenţa şi gradul de intensitate a modificării activităţii enzimatice vizate, le-am întîlnit nu printre acestea, ci în boala Hodgkin, a cărei etiopatogenie oscilează între aceea a procesului inflamator şi a celui neoplazic, punînd uneori grele probleme de diagnostic diferenţial anatomo-clinic.

MATERIAL ŞI METODĂ

Observaţiile au fost făcute pe un lot de 167 de cazuri, dintre care 100 de hepatită cronică — 16 verificate biopsic — (forme uşoare 20, forme medii 60, forme grave 20), 15 de limfogranulomatoză malignă, 20 cu alte hemopatii maligne ale seriei albe, 10 cu hemopatii diverse ale seriei roşii, 12 cu poliartrite cronice evolutive (P.C.E.) şi 10 cazuri normale.

Activitatea cuprooxidază serică a fost determinată prin metoda indicată de Ravin — varianta 1961 [11] —, folosind ca substrat parafenilen-diamina hidroclorică, recristalizată din acetonă [10], cu incubaţie de o oră la 37°, în mediu tamponat la pH 5,5 cu tampon acetat-acid acetic (folosind ca substrat benzidina, incubaţia durează 18 pînă la 24 de ore la acelaşi pH optim). După o oră, reacţia este întreruptă prin azidă de sodiu, inhibiţia totală a oxidării (componente neenzimatice) fiind obţinută prin menţinerea sistemului de reacţie la răcitor, la 4°, timp de 30 min. Rezultatele sînt exprimate în unităţi convenţionale de extincţie, după citire la fotometru, cu filtrul S_{53}, în strat de 10 mm. Valorile normale în condiţiile noastre de lucru sînt cuprinse între 20 şi 35 u., cu eroare standard de ± 5 u. Unităţile de densitate optică pot fi convertite în miligrame ceruloplasmină %, prin înmulţirea extincţiei cu factorul Holmberg-Laurell = 87,5, pe care autorii l-au stabilit ca valoare medie a datelor obţinute prin folosirea

a trei preparate diferite de ceruloplasmină purificate. Datele noastre echivalează astfel cu 16,5 pînă la 32 mg% ceruloplasmină la normal, concordînd deci pentru limita superioară cu valorile indicate de Ravin în 1961, şi anume : 32,3 ± 4,9 mg%. Limita inferioară, mai scăzută, obţinută die noi ne-o explicăm prin faptul că nu am putut utiliza în manipulări sticlărie siliconată, fapt care, după afirmaţia lui Ravin, poate conduce la modificări ale componentei proteice enzimatice, avînd drept consecinţă scăderi ale activităţii sale datorită condiţiei tehnice de lucru [11].

REZULTATE

Valorile obţinute pentru activitatea enzimatică măsurată se repartizează în raport cu numărul şi natura cazurilor observate, aşa cum este indicat în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Numărul, natura şi repartiţia cazurilor observate

Lotul de observaţii	Nr. cazuri	Repartiţia cazurilor după valoarea cuprooxidazei serice (în u. ext.)					Valoarea medie (în u. ext.)
		20—35	35—55	55—75	75—90	90—122	
Normal	10	10	—	—	—	—	30
Hepatită cronică (formă uşoară, simpt. astenonevrotică)	20	6	8	6	—	—	45
Hepatită cronică (formă medie, splenohepatomeg. moderată, sindr. hem.)	60	20	30	10	—	—	49
Hepatită cronică (formă gravă, hepatosplenomeg., preciroză)	20	8	8	4	—	—	47
Boala Kodgkin	15	—	2	2	4	7	97
Tumoare mediast. (suspect boală Hodgkin)	2	2	—	—	—	—	25
Reticuloză malignă	6	2	—	1	2	1	70
Limfosarcom	3	—	—	2	1	—	79
Limfoleucoză cronică	2	—	1	1	—	—	65
Mieloleucoză acută	2	—	—	—	2	—	85
Mieloleucoză cronică	5	1	—	2	2	—	81
P.C.E.	12	4	3	5	—	—	59
Hemopatii diverse (serie roşie)	10	10	—	—	—	—	32

În ansamblul rezultatelor (tabela nr. 1) se observă că cele mai ridicate valori ale cuprooxidazei (între 70 şi 122 u., cu valoarea medie 97) se întîlnesc la boala Hodgkin, procentul fiind de 72 ; trebuie subliniat că determinări repetate de cinci ori în cursul unei evoluţii de aproximativ 2 ani au înregistrat de fiecare dată valori ridicate. S-au înregistrat de asemenea creşteri pînă la 90 u. în medie, în unele reticuloze maligne, limfosarcom, mieloleucoza acută şi cronică acutizată.

În hepatita cronică, valoarea medie a creşterii activităţii merge pînă la 47 u., în 76 din cele 100 de cazuri observate.

În P.C.E., valoarea medie a creşterii a fost de 57 u. în 66% din cazurile observate.

Tuturor bolnavilor li s-au efectuat protidograme, proteinemia totală prin metoda Weichselbaum [14] şi li s-au determinat fracţiunile electroforetice prin electroforeză pe hîrtie.

În cazurile de hepatită cronică s-au practicat şi următoarele teste de labilitate serică proteică: timol, Takata într-un tub, cu evaluarea turbidimetrică, formol şi sulfat de cadmiu; testele au prezentat alterări la 80% din cazurile observate, corespunzător unei alterări electroforetice la 70% din cazuri, caracterizată prin scăderea albuminelor, creşterea gama- şi uneori betaglobulinelor. Sindromul de citoliză — exprimat prin triada enzimatică aldolază (determinată prin metoda Ananiev-Obuhov [1], varianta Siebley-Lehninger-Bruns), GPT şi GOT (metoda Bruyet [4]) — a fost prezent în 40% din cazuri, în special pentru aldolază şi GPT. Puncţia biopsică a confirmat în 15 dintre aceste cazuri reacţia inflamatorie mezenchimală prin infiltraţie limfoplasmocitară în spaţiile porte, hiperplazia kupferiană, poliferarea conjunctivă, alături de reacţii de distrofie proteică.

În toate cazurile de P.C.E. s-a determinat V.S.H. şi reacţia Ayala cu difenilamină pentru acidul neuraminic, cu exprimare în unităţi Dische. În 9 cazuri creşterea constantă a V.S.H. şi valoarea mai mare de 0,45 a reacţiei Ayala [5], concomitent cu creşterea alfa$_2$-globulinelor pînă la 24%, confirmă stadiul evolutiv al procesului inflamator poliartritic.

În 8 din cele 15 cazuri de boală Hodgkin, electroforegrama prezintă creşterea alfa$_2$- globulinelor, valorile oscilînd între 14 şi 24%; în 2 cazuri cu evoluţie severă, visceralizate şi terminate prin exitus, 5 electroforegrame repetate la intervale variabile indică valori ale alfa$_2$- globulinelor între 19,1 şi 24,2. Toate cazurile cu alfa$_2$- globuline crescute au activitatea cuprooxidazică între 90 şi 120.

În 10 cazuri de boală Hodgkin, cu activitate cuproxidazică 75—122, s-a determinat şi cupremia, prin metoda Zausch cu dietil-ditiocarbamat [7], [17], cu apreciere spectrofotometrică a rezultatelor, citirea fiind făcută în strat de 2 cm, la lungimea de undă de 470 mμ. În 8 cazuri, controlate în plină evoluţie, cupremia a variat între 135 şi 280 gama %. Nu am putut stabili însă în aceste cazuri un raport de proporţionalitate directă între cupremie şi activitatea cuprooxidazei serice.

În restul hemopatiilor diverse, de serie roşie, studiate, nu am observat modificări semnificative ale cuprooxidazei serice.

DISCUŢII

Plecînd de la intenţia de a găsi un test indicator al evoluţiei hepatitei cronice către ciroză, am ajuns la observaţia că nu în această afecţiune, ci în limfogranulomatoza malignă se pot întîlni creşteri ale cuprooxidazei serice pînă la de 3—4 ori valoarea normală. Această modificare umorală, deşi nu reprezintă un semn patognomonic — ea producîndu-se cu mai mică amploare şi în alte limfadenopatii maligne, precum şi în afecţiuni cronice inflamatorii tip P.C.E. şi hepatită cronică cu reacţie mezenchimală —, ar putea constitui o probabilitate diagnostică diferen-

țială pentru limfogranulomatoza malignă în cazuri de incertitudine anatomo-clinică.

Mecanismul creșterii activității cuprooxidazice și cel al hipercupremiei concomitente, este uneori dificil de elucidat. Este riscant să considerăm creșterea acestei activități enzimatice drept expresia unui sindrom de citoliză, dat fiind că nu se cunosc bine localizarea ei intracelulară și corelațiile cu celelalte sisteme enzimatice endocelulare. În

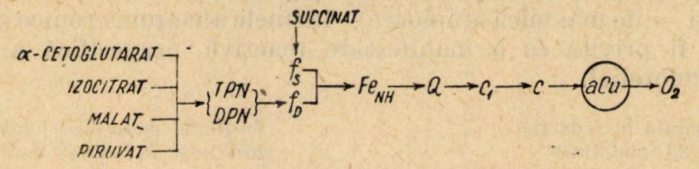


Fig. 1. — Lanțul mitocondrial de transport electronic (după D. Green).

f_S = succinilflavoproteină; Fe_{NH} = fier nehemic; c, c_1 = citocromi; f_D = DPNH flavoproteină; Q = coenzime Q; aCu = citocrom; aCu = proteină.

stadiul actual al cunoștințelor asupra corelațiilor infrastructură-funcție, nu se poate presupune altfel decît ipotetic existența unei legături între creșterea cuprului seric, a activității cuprooxidazei serice și alterarea lanțului mitocondrial al transportului electronic, așa cum este figurat în figura 1 alăturată, după David Green [6].

Se știe că la nivel mitocondrial există o asociație constantă între citocromoxidază și cupru; pentru fiecare hem citocromoxidazic există un atom de cupru, iar ambii sînt legați cu aceeași proteină, care poate fi caracterizată ca o cuproproteină. Nu se știe însă ce raport poate fi stabilit între aceasta și ceruloplasmină.

Faptul creșterii cuprooxidazei serice în boala Hodgkin, dar în grad mai mic și în alte limfo- și hemopatii maligne și mai puțin în P.C.E. și în unele hepatite cronice postvirale (după datele din literatură și în neoplazii și necroze tisulare), ar putea fi interpretat ca o manifestare reactivă nespecifică, legată de iritarea sistemului reticulo-endotelial, ca și sindromul disproteinemiei, caracterizat prin creșterea unor fracțiuni globulinice, alfa$_2$- și gama sau alfa$_2$,- gama și beta.

Creșterea activității cuprooxidazei serice, mai ridicată în boala Hodgkin decît în celelalte afecțiuni observate, ar putea ține de un dezechilibru efector mai accentuat în procesul hodgkinian decît în celelalte stări morbide. Creșterea activității ceruloplasminei în limfogranulomatoza malignă nu poate contribui însă cu nimic la soluționarea dilemei asupra naturii inflamatorii sau neoplazice a acestui proces, în grade mai mici ea putînd fi regăsită în ambele.

CONCLUZII

1. În cazurile observate s-au întîlnit creșteri de 3 pînă la 4 ori valoarea normală a cuprooxidazei serice (90—122 u., valoarea medie 97 u.) în boala Hodgkin, în 72% din cazuri. Creșteri ale aceleiași acti-

vităţi enzimatice — de mai mică amploare şi frecvenţă — au fost întîlnite, în ordine descrescîndă, şi în reticuloza malignă, limfosarcom, mieloleucoza acută şi cea cronică acutizată, în P.C.E. şi în hepatita cronică postvirală.

2. Modificarea întîlnită în boala Hodgkin — prin gradul de intensitate, persistenţă şi frecvenţă — ar putea constitui un element de probabilitate diagnostică diferenţială între boala Hodgkin şi alte limfoame maligne, în cazuri de incertitudine diagnostică anatomo-clinică.

3. Creşterea activităţii cuprooxidazei serice în cursul unor hemopatii maligne, şi — de mai mică amploare — în unele afecţiuni cronice inflamatorii ar putea fi privită ca o manifestare reactivă nespecifică a sistemului reticulo-endotelial.

Prezentată la redacţie
la 23 iulie 1963

Institutul de medicină internă al Academiei R.P.R. şi al M.S.P.S.

BIBLIOGRAFIE

1. * * * *Instrucţiuni pentru profilaxia şi combaterea hepatitei epidemice*, Bucureşti, 25 (1959).
2. ABDERHALDEN R., *Klinische Enzymologie. Die Fermente in der Pathogenese, Diagnostik und Therapie*, Stuttgart, Edit. G. Thieme (1958).
3. BROWN R. K., Klin. Wschr., **36**, *1* 1 (1958).
4. BRUYET P., MAIGNIEN-GAUTHIER CH., DELAUNAY A., Ann. biol. clin., *10—12*, 661 (1958).
5. GALLETTI F., GELLI G., *Le glicoproteine. Biochimia, fiziologia e patologia*, Bologna Medica, 1958, p. 138.
6. GREEN D., GOLDBERGER R., Amer. J. Med., **30**, *5*, 666 (1961).
7. HINSBERG K., LANG K., *Medizinische Chemie*, München-Berlin-Viena, Edit. Urban — Schwarzenberg, 1957.
8. HORNYKIEWICZ O., *Aktuelle Probleme des Mineral-stoffwechsels, Vorträge und Diskussionen des Internationalen Expertentagung 1960*, Darmstadt, Edit. D. Steinkopff, 124 (1961).
9. KEIDERLING W., *Aktuelle Probleme des Mineralstoffwechsels, Vorträge und Diskussionen des Internationalen Expertentagung 1960*, Darmstadt, Edit. D. Steinkopff, 131 (1961).
10. RAVIN H. A., The Lancet, *1*, 726 (1956).
11. RAVIN H. A., J. Lab. clin. Med., **28**, *1*, 161 (1961).
12. SORU E., *Biochimia medicală*, Bucureşti, Edit. medicală, 1959.
13. SULLIVAN J. F., KATHLEEN, T., HART F. D., J. Lab. clin. Med., **55**, *2*, 260 (1960).
14. WUHRMANN F., MÄRKI H. H., *Dysproteinämien und Paraproteinämien*, Basel, Edit. B. Schwabe, 1963.
15. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., Probl. terap., *4*, 15 (1959).
16. ZAMFIRESCU-GHEORGHIU M., Med. int., *12*, 1761 (1959).
17. ZAUSCH G., Klin. Wschr., **33**, 954 (1955).

Ing. I. VASILESCU: *Tehnologia și aplicațiile industriale ale enzimelor*, București, Edit. tehnică, 1963

De curînd a apărut în Editura tehnică lucrarea *Tehnologia și aplicațiile industriale ale enzimelor*, de ing. I. Vasilescu.

Dacă lucrarea *Enzimele*, de același autor (editată în 1961 de Editura Academiei R.P.R.), se referă la bazele teoretice ale enzimologiei, la descrierea enzimelor și sistemelor enzimatice mai importante, *Tehnologia și aplicațiile industriale ale enzimelor* — care poate fi considerată ca o continuare sau un al II-lea volum al primei cărți — are caracterul unei lucrări de enzimologie aplicată; în ea sînt tratate aspectele tehnice ale obținerii preparatelor enzimatice și folosirea acestora, precum și aplicațiile practice ale enzimelor în diferite domenii de activitate, în special în industria prelucrătoare de produse de origine vegetală și animală.

În prima parte a cărții, care cuprinde trei capitole, sînt tratate aspectele generale ale tehnologiei preparatelor enzimatice. Sînt discutate sursele de enzime, acordîndu-se o atenție deosebită microorganismelor, selecției și prelucrării lor pentru obținerea concentratelor enzimatice; sînt prezentate de asemenea o serie de metode de extracție, concentrare, purificare și cristalizare a enzimelor.

Partea a doua, alcătuită din 5 capitole, se referă la obținerea principalelor preparate enzimatice utilizate în scopuri practice, ca de exemplu cele cu activitate esterazică, glicozidazică, amidazică, peptidazică și altele.

Partea a treia a cărții se referă la aplicațiile practice ale enzimelor. Pornind de la biosinteza și degradarea hidraților de carbon, a acizilor grași și a substanțelor proteice, autorul discută o serie de procese enzimatice din domeniul industriei fermentative și de biosinteză. Astfel sînt expuse, pe de o parte, procesele enzimatice din fermentația alcoolică, lactică și propionică, făcîndu-se referiri la aplicațiile acestora în diferite sectoare ale industriei alimentare, iar pe de altă parte aplicațiile care decurg din ciclul acizilor tricarboxilici singur și combinat cu ciclul glioxilatului.

Într-un alt capitol sînt redate procesele enzimatice care au loc în produsele de origine animală și vegetală în timpul păstrării și prelucrării lor industriale (refrigerare, congelare, uscare, maturarea și frăgezirea cărnii, rîncezirea grăsimilor etc.).

Ultimul capitol al acestei părți se referă la folosirea preparatelor enzimatice pentru ameliorarea calității și utilizarea enzimelor ca indici de calitate a diferitelor produse alimentare; sînt discutate de asemenea aplicațiile enzimelor în alte sectoare de activitate, ca, de exemplu, în industria textilă, tăbăcărie, zootehnie și medicină.

Cartea este ilustrată cu o serie de scheme, fotografii de utilaj, scheme tehnologice, grafice şi cuprinde 238 de indicaţii bibliografice.

Tehnologia şi aplicaţiile industriale ale enzimelor, de Ing. I. Vasilescu, se adresează specialiştilor din diferitele ramuri ale industriei alimentare şi uşoare, chimiştilor şi în special biochimiştilor. Ea este utilă studenţilor institutelor de învăţămînt superior legate de industria alimentară şi uşoară, precum şi celor de la Facultăţile de chimie şi ştiinţe naturale.

Sîntem siguri că această carte va contribui la creşterea interesului pentru cercetarea şi aplicarea în practică a enzimelor.

S. Vasu

DAVID DAVIDESCU, MIRCEA IONESCU, MAGDA IVĂNESCU, HORIA SLUŞANSCHI, GHEORGHE PAVLOVSCHI: *Metode de analiză chimice şi fizice folosite în agricultură*, Bucureşti, Edit. Acad. R.P.R., 1963.

În Editura Academiei R.P.R. a apărut cartea *Metode de analiză chimice şi fizice folosite în agricultură*, de David Davidescu, Mircea Ionescu, Magda Ivănescu, Horia Sluşanschi şi Gheorghe Pavlovschi, care tratează ansamblul metodelor analitice folosite în chimizarea agriculturii. Prin ea se pune la dispoziţia laboratoarelor chimico-agronomice şi, în general, a oamenilor de ştiinţă şi de specialitate o parte a materialului documentar necesar pentru uşurarea muncii în acest domeniu. Cartea cuprinde 492 p. şi este alcătuită din 8 părţi.

Prima parte se referă la analiza materiei vegetale, descriindu-se analiza sumară şi analiza elementară, precum şi o serie de metode de determinare a glucidelor, materiilor grase, uleiurilor eterice, protidelor, alcaloizilor, aciditătii, vitaminelor şi activităţii unor enzime.

Partea a II-a se ocupă de analiza solului. Se descriu modul de determinare a cantităţii totale de elemente din sol, studiul proceselor care au loc în sol (adsorbţie, desorbţie, solubilizare, mobilizare biochimică), determinarea elementelor nutritive mobilizabile prin extracţie simplă, prin extracţii repetate şi prin extracţie cu soluţii de electroliţi, determinarea pH şi rH şi a activităţii microbiologice.

Partea a III-a tratează despre diagnosticul foliar, descriind metode rapide de determinare a principalelor elemente nutritive din plantă şi interpretarea rezultatelor obţinute.

În partea a IV-a autorii se ocupă de analiza îngrăşămintelor şi amendamentelor, descriindu-se metode pentru recunoaşterea principalelor îngrăşăminte minerale şi amendamente, precum şi pentru analiza cantitativă a îngraşămintelor minerale, organice şi amendamentelor.

Partea a V-a cuprinde analiza apei de irigare, în care se descriu metode de analiză chimică a apei, precum şi metode pentru îmbunătăţirea calităţii ei.

Partea următoare se ocupă de recunoaşterea substanţelor chimice folosite în protecţia plantelor, descriindu-se tehnica recunoaşterii lor, caracterele specifice ale celor mai obişnuite substanţe folosite în protecţia plantelor şi reacţii de identificare şi diferenţiere a substanţelor chimice folosite mai des în protecţia plantelor.

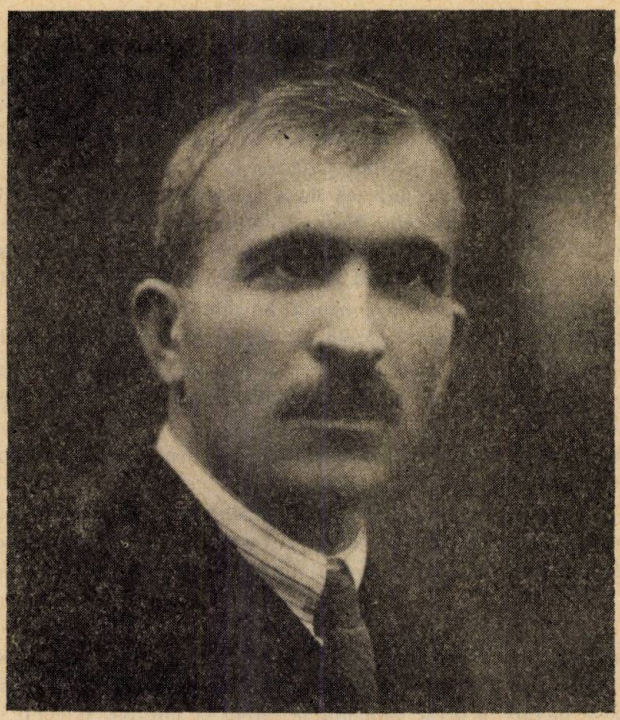
Penultima parte descrie sumar două metode speciale de analiză, şi anume cromatografia şi electroforeza, aplicate la studiul proteinelor vegetale.

Ultima parte cuprinde reţete de preparare a reactivilor folosiţi în laboratoarele de chimie agricolă şi indicate în metodele descrise în cuprinsul cărţii. Sînt de asemenea date o serie de tabele de evaluare a glucozei şi zahărului invertit, a lactozei şi a maltozei, indicele de refracţie al soluţiilor de zaharoză etc.

Bibliografia finală conține 47 de indicații, în special de cărți.

Această carte are meritul că scoate în evidență legătura ce există între sol, plantă și îngrășământ în perioada de vegetație, ceea ce duce la posibilitatea unei interpretări juste a rezultatelor obținute în laborator și pe cîmp. Ea reprezintă un ajutor real adus chimiștilor, biochimiștilor și agronomilor, biologilor și pedologilor și tuturor celor care se preocupă pe tărîmul științei sau în practică de probleme agricole. Apariția ei reprezintă realizarea unei necesități izvorîte din Directivele Congresului al III-lea al P.M.R. care trasează calea unei dezvoltări intensive a agriculturii.

Victoria Alexandrescu



ACADEMICIANUL RADU VLĂDESCU

(1886—1964)

În ziua de 15 II 1964 a încetat din viaţă academicianul Radu Vlădescu, unul dintre biochimiştii romîni cunoscuţi.

S-a născut la 27 aprilie 1886, în comuna Sibiciul de Sus, judeţul Buzău (azi raionul Cislău). După terminarea şcolii primare, învăţătorul său, uimit de dragostea pentru carte a fiului de ţăran sărac din munţii Buzăului, îl încurajează să înveţe mai departe. Luptînd din greu cu nevoile materiale, termină în chip strălucit liceul din Buzău (1904), apoi se înscrie la Şcoala veterinară.

Student strălucit, este numit preparator în anul 1908 la catedra de chimie a profesorului A. Babeş. Remarcat încă din cursul anilor studenţiei de către marele fiziolog I. Athanasiu, este sfătuit să se înscrie la Facultatea de fizico-chimice a Universităţii din Bucureşti, pe care o absolvă în 1918. Capătă după aceea o bursă pentru a-şi continua studiile la Paris.

Contactul cu laboratorul marelui savant G. Bertrand este hotărîtor pentru viitorul tînărului romîn.

Acomodîndu-se admirabil atmosferei de lucru şi de studiu, caracteristică Institutului Pasteur, Radu Vlădescu este remarcat de G. Bertrand care a avut toată viaţa, pentru dînsul, o afecţiune şi apreciere deosebită.

După o teză de răsunet la Sorbona, se întoarce în ţară şi este numit pe rînd conferenţiar la Facultatea de ştiinţe, profesor suplinitor la Facultatea de medicină din Bucureşti şi apoi profesor titular la Facultatea de medicină veterinară (1923), unde funcţionează continuu.

timp de 30 de ani. Aici inițiază imediat organizarea unui laborator de chimie biologică, primul de acest gen în țară în acea vreme. Mulți oameni de știință vizitau pe profesorul Radu Vlădescu pentru lămurirea unor probleme de specialitate sau însușirea noilor tehnici de lucru. Dintre aceștia amintim numai pe savantul profesor Gh. Marinescu, care avea o caldă afecțiune și o stimă deosebită pentru profesorul Radu Vlădescu.

O muncă intensă la catedră, dublată de o activitate științifică susținută, a făcut să crească prestigiul său și al laboratorului. Cercetările efectuate sînt apreciate și consultate de oamenii de știință de pretutindeni. Totodată, profesorul Radu Vlădescu răspundea cu mare plăcere la solicitările practicienilor, ținînd conferințe de popularizare a noilor cuceriri științifice și scriind articole de îndrumare în domeniul biochimiei aplicate.

Meritele deosebite acumulate în decursul anilor de muncă i-au fost recunoscute de diferite societăți științifice. A fost membru al Academiei de Medicină din Paris, al Academiei de medicină veterinară din Franța, iar în anul 1953 Academia R.P.R. îl cooptează printre membrii săi titulari.

Cu ocazia împlinirii a 70 de ani, este sărbătorit în cadrul Secției de chimie a Academiei și decorat cu Ordinul Muncii clasa I.

Profesorul Radu Vlădescu a luptat pentru înființarea primei reviste de biochimie din R.P.R., făcînd parte din comitetul de redacție. Apariția acestui buletin de specialitate i-a dat o mare satisfacție, deoarece constituia unul din deziderateie vieții sale științifice.

★

Opera științifică a profesorului Radu Vlădescu este bogată și interesantă.

Format la școala lui Bertrand, el a dedicat o mare parte a cercetărilor sale analizei materiei vii. Primele lucrări în acest domeniu se referă la dozarea zincului în seria animală. Perfecționînd metoda propusă de G. Bertrand (izolarea zincului ca zincat de calciu), o transformă într-o micrometodă gravimetrică specifică, foarte exactă, reușind după o muncă susținută să arate care este repartiția acestui element în organismul vertebratelor și al nevertebratelor. Cu această ocazie pune în evidență o serie de fapte noi ca : bogăția în zinc a organelor sexuale, conținutul ridicat în acest element al moluștelor, deși apa de mare este mult mai săracă în zinc, variația conținutului în zinc cu alimentația mamiferelor etc. Aceste cercetări au căpătat o notorietate mondială, fiind considerate azi clasice.

Adaptează apoi metoda lui Copaux la microdozarea fosforului din țesuturi și lichidele biologice, fiind printre primii care stabilesc repartiția acestui element în diferitele etaje ale sistemului nervos. Această tehnică îi slujește și la microdozarea cazeinei din lapte, pe baza faptului că procentul de fosfor al cazeinei este constant.

Propune un defecant nou, ferocianura de cupru, ușor de obținut în laborator și care s-a dovedit excelent pentru îndepărtarea mucinelor din lichidele bogate în aceste glucoproteine. Se știe că aceste substanțe ridică probleme dificile la clarificarea lichidelor biologice.

Imaginează o serie de aparate ca : un microureometru, un tensiovîscozimetru și propune o tehnică microsedimentometrică cu aplicații la dozarea glucidelor reductoare, a sulfului, fosforului, clorului, potasiului, volumului globular etc. Cu ajutorul acestei tehnici profesorul Radu Vlădescu continuă cercetările sale, stabilind conținutul de cloruri, fosfor, potasiu, sodiu etc. în numeroase țesuturi și lichide biologice.

Acordă o atenție deosebită controlului chimic al laptelui, pentru urmărirea fraudelor și a bolilor mamelei. Este primul din țară care atrage atenția asupra importanței controlului igienic al laptelui. Stabilește o micrometodă pentru analiza completă a laptelui, pe un volum foarte redus, ceea ce prezintă un interes deosebit pentru cercetarea metabolismului glandei mamare, mai ales în cazul animalelor de laborator : șobolan, cobai etc.

Urmează apoi o serie de lucrări prin care se demonstrează că analiza lichidelor biologice poate pune în evidență anumite carențe la animale, existența unei legături între tipul de metabolism al speciilor și compoziția chimică a urinei și altele.

Studiind valoarea raportului C/N din urina animalelor profesorul Radu Vlădescu semnalează pentru prima oară faptul că valoarea acestui raport este mult mai mare la bovidee (5,65) decît la om (0,85—0,92) și că la pisică ea este cea mai mică (0,5—0,6), ceea ce denotă existența unor deosebiri nete între tipurile de metabolism în seria animală, deosebiri provocate mai ales de activitatea nervoasă superioară.

De asemenea demonstrează că modificările compoziției lichidelor biologice depind în cea mai mare măsură de influența factorilor de mediu, mai ales de alimentație, analiza chimică putînd constitui un mijloc sigur și rapid pentru recunoașterea deficiențelor în acest domeniu. Astfel, la vacile ale căror rații alimentare sînt dezechilibrate din punctul de vedere al raportului Ca/P, în sensul că procentul de calciu este scăzut, urina se acidifiază, făcîndu-și concomitent apariția acidul fosforic, care în mod normal nu se întîlnește în urina bovideelor. Această deficiență poate avea rezultate dezastruoase pentru animalele în lactație și poate fi surprinsă ușor prin dozarea fosfaților urinari.

Într-o serie de lucrări în care studiază compoziția chimică a salivei, profesorul Radu Vlădescu face constatarea că saliva normală nu conține uree, spre deosebire de aceea recoltată în urma injectării de pilocarpină sau arecolină. În schimb, la unele specii, saliva normală este foarte bogată în săruri de amoniu. Aceste constatări au condus la următoarele concluzii:

1) În salivă se găsește un ferment analog ureazei, care descompune ureea. Această transformare are loc în gură și nu în glandele maxilare.

2) Există o strînsă legătură între conținutul în uree al sîngelui și sărurile de amoniu din salivă (indicele de hipobromit), iar determinarea indicelui hipobromic al salivei poate da indicații precise asupra procentului de uree din sînge.

3) Saliva are rolul important de a neutraliza acizii organici care rezultă în urma activității metabolice, economisind în acest fel bazele fixe din sînge și țesuturi.

Extinderea acestor cercetări și la alte porțiuni ale tractului digestiv a condus pe profesorul Radu Vlădescu la descoperirea unei noi funcțiuni a stomacului, și anume aceea de organ de excreție a ureei, pe care o transformă în produși de hidroliză amoniacali.

Această funcțiune se manifestă atît în mod normal, cînd stomacul elimină o parte din ureea sanguină sub formă de săruri de amoniu, dar mai ales în cazul unei insuficiențe renale, ca în nefritele acute sau cronice, cînd această cantitate sporește între 5 și 10 ori față de normal.

Tot atît de interesante sînt cercetările cu privire la eliminarea altor compuși cu azot prin stomac, cum e cazul creatininei, dar mai ales al produșilor de degradare ai protidelor în afecțiunile tumorale ale stomacului. În acest caz se constată că are loc o proteoliză intensă, datorită peptidazelor secretate de către pereții stomacului, și apariția aminoacizilor în lichidul gastric. Faptul poate servi la diagnosticul precoce al tumorilor stomacale de origine neoplazică, metoda întrecînd în sensibilitate și siguranță toate metodele cunoscute pînă azi.

Un alt domeniu deosebit de interesant din punct de vedere practic și științific care l-a preocupat pe profesorul Radu Vlădescu este studiul compoziției și toxicității veninului batracienilor și al reptilelor. Cercetările lui Bertrand și Phisalix stabiliseră metoda de obținere a antiveninurilor și a vaccinării antiveninoase, însă rezultatele nu erau constante. Profesorul Radu Vlădescu demonstrează, după cercetări prelungite conduse în laboratorul profesorului G. Bertrand (1939—1941), că faptul se datorește variabilității sezoniere a toxicității veninului de viperă.

Mecanismul contracției musculare a constituit de asemenea o preocupare a profesorului Radu Vlădescu. Într-un studiu care părea îndrăznet la acea vreme (1920), emite ipoteza că

energia contracției musculare se datorește travaliului osmotic provocat de dispariția glucozei din țesuturi. Cunoștințele actuale cu privire la rolul A.T.P. ar părea că anulează complet această ipoteză; recent însă P. Mitchell (*Nature*, **191**, 144, 1961) propune un nou mecanism chemiosmotic pentru explicarea fosforilării oxidative și fosforilării fotosintetice, care scoate în evidență că energia necesară acestor procese chimice poate fi furnizată de travaliul osmotic produs prin transferul electronic de o parte și de alta a membranei mitocondriale. Această teorie, care întrunește sufragiile a numeroși oameni de știință, este mai cuprinzătoare decît teoria chimică și scoate în evidență rolul de precursor al profesorului Radu Vlădescu în problema surselor energetice ale transformărilor fizico-mecanice din țesuturi.

Cunoștințele deosebite ale profesorului Radu Vlădescu în problema contracției musculare au fost apreciate în mod deosebit de savanții I. Athanasiu și Gh. Marinescu, care au recurs la luminile sale cu ocazia întocmirii memoriului cu privire la natura forțelor care acționează în mușchii parkinsonienilor.

Profesorul Radu Vlădescu a ținut numeroase conferințe și a publicat multe articole prin care a căutat să aducă la cunoștința maselor largi cuceririle științifice cele mai noi și modul cum ele pot fi puse în slujba progresului social și economic. A evocat cu un talent deosebit viața și opera unor oameni de știință. Se citesc cu deosebită emoție și interes cele scrise despre marele Pasteur, dr. C. Davila, profesorul I. Athanasiu, profesorul P. Riegler, dr. I. Cantacuzino etc.

Opera științifică a academicianului Radu Vlădescu este bogată în fapte și idei. Scrisă într-un stil clar și concis, care îl caracteriza, este un izvor nesecat de învățăminte și poate fi consultată mereu cu folos.

L. Buruiană

MEMORII ȘTIINȚIFICE

1. *Recherches physico-chimiques sur l'humeur aqueuse des yeux de bœuf.* În colaborare cu A. Babeș. C.R. Soc. Biol., t. 76, p. 320, 1914.
2. *Réaction d'Abderhalden dans le charbon bactéridien.* În colaborare cu I. Popescu. C.R. Soc. Biol., t. 77, p. 462, 1914.
3. *Réaction d'Abderhalden dans la morve.* În colaborare cu I. Popescu. C.R. Soc. Biol., t. 77, p. 586, 1914.
4. *Substances thérmosolubles dans le sérum des chevaux morveux.* În colaborare cu I. Popescu. C.R. Soc. Biol., t. 78, p. 492, 1915.
5. *L'interprétation des transformations de l'énergie dans le travail musculaire.* Revue générale des Sciences, 1920.
6. *Recherches sur la répartition du zinc dans l'organisme du cheval.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 171, p. 744, 1920.
7. *Recherches sur la répartition du zinc dans l'organisme du cheval.* În colaborare cu G. Bertrand. Bull. Soc. Chim., t. 29, p. 53, 1921.
8. *Sur les causes de variation de la teneur en zinc des animaux vertébrés.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 172, p. 768, 1921.
9. *Sur la variation de la teneur en zinc de l'organisme du lapin durant la croissance.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 173, 1921.
10. *Intervention probable du zinc dans les phénomènes de fécondation chez les animaux vertébrés.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 173, p. 176, 1921.
11. *Recherches sur la présence et le rôle du zinc chez les animaux.* Thèse, Paris, 1921.

12. *Sur la teneur en zinc des organes du lapin et de quelques vertébrés.* În colaborare cu G. Bertrand. Bull. Soc. Chim., t. 31, p. 268, 1922.
13. *Sur la force dynamique et la force statique des muscles chez les parkinsoniens.* În colaborare cu I. Athanasiu şi G. Marinescu. C.R. Soc. Biol., t. 86, p. 17, 1922.
14. *Sur la détermination de la solubilité des corps.* C.R. Soc. Biol., t. 86, p. 890, 1922.
15. *Action thérapeutique du trépol dans quelques trypanosomiases.* În colaborare cu Iriminoiu. C.R. Soc. Biol., t. 88, p. 287, 1923.
16. *Sur la teneur en zinc du corps de certains invertébrés.* În colaborare cu G. Bertrand. Bull. Soc. Chim., t. 33, p. 1 341, 1923.
17. *Le principe du déplacement de l'equilibre s'applique-t-il en biologie?* C.R. Soc. Biol., t. 89, p. 910, 1923.
18. *La diffraction de la lumière par les cils.* C.R. Ac. Sc., t. 91, p. 512, 1924.
19. *Adaptation de la méthode de Copaux au dosage des phosphates urinaires.* C.R. Soc. Biol., t. 91, p. 514, 1924.
20. *Le dosage des chlorures dans les liquides biologiques.* C.R. Soc. Biol., t. 92, p. 546, 1924.
21. *Sur la teneur en phosphore de la caséine.* C.R. Soc. Biol., 1924.
22. *Sur une méthode très simple permettant l'étude de la répartition des graisses dans l'organisme animal.* Bull. Soc. Chim. Biol., t. 93, p. 755, 1925.
23. *Solubilisation de la matière organique du lait par l'acide azotique. Ses applications. Dosage de la graisse.* Le Lait, 1925.
24. *Adaptation de la méthode de Copaux au dosage de l'acide phosphorique du lait et ses applications.* C.R. Soc. Biol., t. 96, p. 1 025, 1927.
25. *Le rapport carbone-azote dans l'urine de quelques mammifères.* C.R. Soc. Biol., t. 97, p. 393, 1927.
26. *Étude de la réserve alcaline chez quelques mammifères domestiques et les facteurs dont elle dépend.* C.R. Soc. Biol., t. 97, p. 999, 1927.
27. *Sur la répartition de l'acide urique dans le sang et sur les causes d'erreurs dans le dosage de ce corps.* C.R. Soc. Biol., t. 98, p. 462, 1928.
28. *Sur le dosage de l'acide urique dans les liquides biologiques.* Bull. Soc. Chim. Biol., t. 10, p. 602, 1928.
29. *Sur la présence de l'urée dans la salive. Ses rapports avec l'urée sanguine.* C.R. Soc. Biol., t. 99, p. 434, 1928.
30. *Recherches sur l'urée et l'ammoniaque des liquides gastriques à l'état normal et sur l'élimination de l'urée par l'estomac.* În colaborare cu D. Simici şi M. Popescu. C.R. Soc. Biol., t. 101, p. 199, 1929.
31. *Recherches sur l'urée et l'ammoniaque des liquides gastriques à l'état pathologique.* C.R. Soc. Biol., t. 101, p. 202, 1929.
32. *Teneur de la salive de l'homme en urée et en sels d'ammonium sous l'influence de la pilocarpine. Rôle des glandes salivaires dans le maintien de la réserve alcaline.* În colaborare cu M. Popescu. C.R. Soc. Biol., t. 101, p. 306, 1929.
33. *Quelques applications de la désagrégation des tissus d'origine animale par l'acide azotique.* Bull. Soc. Chim. Biol., t. 11, p. 986, 1929.
34. *Nouvelles recherches sur l'urée salivaire.* În colaborare cu M. Popescu. C.R. Soc. Biol., t. 107, p. 862, 1931.
35. *Une nouvelle fonction de l'estomac. Rôle de cet organe dans le métabolisme de l'urée.* În colaborare cu D. Simici şi M. Popescu. C.R. Ac. Sc., t. 192, p. 308, 1931.
36. *Sur l'hydrolyse de l'urée sous l'influence de la salive de l'homme.* C.R. Soc. Biol., t. 109, p. 1 001, 1932.

37. *L'élimination de la salipyrine chez l'homme et chez le Chien.* În colaborare cu Ștefănescu. C.R. Soc. Biol., t. 109, p. 1 381, 1932.
38. *Carence minérale chez les vaches laitières.* Volume jubilaire du prof. Porcher, 1932.
39. *Sur l'élimination de la créatinine par l'estomac à l'état normal et dans les néphrites.* În colaborare cu D. Simici, M. Popescu și Bibescu. Archives des maladies de l'appareil digestif, t. 23, 1933.
40. *La méthode de Copaux pour le dosage du phosphore. Ses applications en biologie.* Hommage à la mémoire du prof. Cantacuzène, 1934.
41. *Méthode pour le dosage de la caséine.* C.R. Soc. Biol., t. 117, p. 128, 1934.
42. *Une technique simple permettant l'analyse complète du lait dans un échantillon assez réduit de ce liquide.* Le Lait, t. 15, p. 363, 1935.
43. *Un défécant nouveau et ses applications en biologie.* C.R. Soc. Biol., t. 119, p. 768, 1935.
44. *Comment on peut éviter l'inconvénient le plus sérieux dans les recherches colorimétriques.* C.R. Soc. Biol., t. 120, p. 221, 1935.
45. *Sur la défécation du sang et de l'urine par le ferrocyanure de cuivre.* C.R. Soc. Biol., t. 120, p. 664, 1935.
46. *Sur la présence de l'acide lactique dans la salive de l'homme.* C.R. Soc. Biol., t. 121, p. 275, 1936.
47. *Un nouveau uréomètre.* C.R. Soc. Biol., t. 123, p. 849, 1936.
48. *Influence de la pilocarpine sur le métabolisme glandulaire et musculaire lisse.* În colaborare cu G. Nichita. C.R. Ac. Sc., t. 202, p. 1 533, 1936.
49. *Ein Fortschritt in der Refraktometrie der Milch. XI.* Milchwirtschaflicher Weltkongres Berlin, 1937.
50. *Perfectionnement des méthodes visant le contrôle du lait.* IIe Congrès scientifique de l'alimentation, Paris, 1937.
51. *Le chlore dans la salive de l'homme.* C.R. Soc. Biol., t. 128, p. 317, 1938.
52. *Le potassium dans la salive de l'homme.* În colaborare cu Bellea. C.R. Soc. Biol., t. 129, p. 329, 1938.
53. *Contribution à l'étude du calcium du lait.* Le Lait, t. 19, p. 754, 1939.
54. *Modifications de la composition de la salive et du sang produites par la pilocarpine.* În colaborare cu G. Nichita. C.R. Soc. Biol., 1939.
55. *Teneur en acide ascorbique des yeux chez différentes espèces.* În colaborare cu H. Ștefănescu. C.R. Soc. Biol., t. 132, p. 169, 1939.
56. *La glycémie chez le cobaye et le lapin sous l'influence du venin de cobra.* În colaborare cu G. Bertrand, C.R. Ac. Sc., t. 209, p. 585, 1939.
57. *L'action hyperglycémiante des venins de serpents.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 209, p. 818, 1939.
58. *Une méthode simple permettant le dosage facile de la cellulose.* C.R. Ac. Sc., t. 211, p. 150, 1940.
59. *Une technique Micro-Bertrand permettant le dosage facile des sucres réducteurs dans les liquides biologiques.* Bull. Soc. Chim. Biol., t. 22, p. 577, 1940.
60. *Le dosage des sucres réducteurs par microsédimentation.* C.R. Ac. Sc., t. 211, p. 260, 1940.
61. *Le dosage du soufre par microsédimentation. Application au sang.* C.R. Ac. Sc., t. 211, p. 642, 1940.
62. *Le dosage rapide de la cellulose.* Annales des fermentations, t. V, p. 547, 1940.
63. *La glycémie du cobaye et du lapin sous l'influence du venin de cobra.* În colaborare cu G. Bertrand. Bull. Soc. Chim. Biol., t. XXII, p. 5—6, 1940.

64. *Sur l'action hyperglycémiante des venins des serpents.* În colaborare cu G. Bertrand. Bull. Soc. Chim. Biol., t. XXII, p. 7—8, 1940.
65. *Le dosage des chlorures par microsédimentation. Application au lait.* C.R. Ac. Sc., t. 212, p. 238, 1941.
66. *Le dosage du potassium par microsédimentation (dans les liquides biologiques).* C.R. Ac. Sc., t. 212, p. 394, 1941.
67. *Le dosage du phosphore par microsédimentation. Application aux liquides biologiques.* C.R. Ac. Sc., t. 212, p. 641, 1941.
68. *Nouvelle méthode pour la numération des globules rouges du sang.* C.R. Ac. Sc., t. 212, p. 1 051, 1941.
69. *Sur un cas remarquable de variation de toxicité du sang de vipère.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 212, p. 1 063, 1941.
70. *Sur la variation saisonière de toxicité du sang de vipère.* În colaborare cu G. Bertrand. C.R. Ac. Sc., t. 213, p. 153, 1941.
71. *Recherches sur le contenu en acides aminés du suc gastrique anachlorhydrique. Son importance pour le diagnostique du cancer.* În colaborare cu D. Simici. Archives maladies de l'appareil digestif, 1945.
72. *Laptele și vitamina C în Romînia.* În colaborare cu El. Prahoveanu. Bul. Acad. de Med., 1939.
73. *Măsura volumului hematiilor prin microsedimentație.* Bul. Acad. Med., 1942.
74. *Asupra dozajului clorurilor din lapte.* Bul. Acad. Med., 1945.
75. *Defecația cupro-ferocianică a lichidelor biologice în cercetările toxicologice ale alcaloizilor.* În colaborare cu A. Idiceanu. Bul. Acad. Med., 1945.
76. *Contribuție la studiul laptelui de iapă.* Bul. Acad. Med., 1945.
77. *Metodă de măsură a forțelor moleculare de adeziune în tuburi capilare.* Buletinul Științific al Academiei Romîne, 1948.
78. *Dozajul proteinelor din serul sangvin la cal și cîine.* În colaborare cu M. Anghelovici. Buletinul Institutului de patologie și igienă veterinară, 1952.
79. *Contribuție la studiul metabolismului clorului.* În colaborare cu A. Idiceanu. Anuarul Inst. de patologie și igienă veterinară, 1952.
80. *Dozajul clorului. Raport eritroplasmatic.* Acad. R.P.R., 1952.
81. *Contribuții la metoda colorimetrică de dozaj a colesterolului.* În colab. cu S. Oeriu. Com. Acad. R.P.R., t. IV, nr. 3—4, p. 144, 1954.
82. *Fosfatazele în tuberculoză.* În colab. cu I. Bălănescu. Probleme de terapeutică, vol. III, p. 111, 1956.
83. *Aparat simplu pentru determinarea viscozității și tensiunii superficiale relative a lichidelor biologice.* St. cerc. chimie, vol. IV, nr. 3—4, p. 235, 1956.
84. *Despre mecanisme fizico-chimice în contracția mușchiului. Rolul presiunii osmotice.* St. cerc. chimie, vol. V, nr. 4, p. 535, 1957.
85. *Tensioviscozimetrul aplicat la controlul higenic al laptelui.* În colab. cu F. Ciocoiu. St. cerc. biochimie, vol. I, nr. 1, p. 19, 1958.
86. *Carotinemia în tuberculoza pulmonară.* În colab. cu I. Bălănescu. St. cerc. biochimie, vol. I, nr. 3, p. 185, 1958.
87. *Constante fizico-chimice din sînge în tuberculoza experimentală și umană.* În colab. cu I. Bălănescu și E. Geraniu. Probleme de terapeutică, vol. X, nr. 4, p. 83, 1959.
88. *Protidemia ca test diagnostic și prognostic în tuberculoză.* În colab. cu I. Bălănescu, I. Tănase, L. Popa, C. Georgescu, E. Vochițu. St. cerc. med. int., vol., I, nr. 2, p. 235, 1960.

89. *Teste fizico-chimice (floculaţie şi microsedimentare) în tuberculoza pulmonară.* În colab. cu I. Bălănescu şi C. Georgescu. St. cerc. med. int., vol. I, nr. 4, p. 465, 1960.
90. *Comportarea particulară a azotiţilor în reacţia Votocek.* În colab. cu N. Roşca. St. cerc. biochimie, vol. III, nr. 1, p. 83, 1960.
91. *Reacţia lui Votocek aplicată la dozarea azotiţilor.* În colab. cu N. Roşca. St. cerc. biochimie, vol. II, nr. 2, p. 129, 1959.
92. *Reacţia lui Votocek aplicată la dozarea cianurilor alcaline.* În colab. cu N. Roşca. St. cerc. biochimie, vol. II, nr. 3, p. 245, 1959.

ARTICOLE ŞI CONFERINŢE ŞTIINŢIFICE

93. *Pasul soldatului. Studiu fiziologic.* Revista ştiinţelor medicale, 1910.
94. *Mecanismul acţiunii serului anticărbunos.* Tezâ, Med. Veterinară, 1911.
95. *Despre vitamine.* Natura, **XII**, 21, 1923.
96. *Diabetul şi insulina.* Natura, **XIII**, 37, 1924.
97. *Bazele ştiinţifice ale alimentaţiei raţionale.* Congresul de zootechnie şi igenă, Cluj, 1924.
98. *Ideile moderne asupra structurii materiei.* Natura, **XV**, 1—3, 1925.
99. *Profesorul I. Athanasiu.* Natura, 1926.
100. *Fapte noi privitoare la alimentaţie.* Revista ştiinţelor medicale, 1927.
101. *Din istoricul chimiei.* Natura, **XIV**, 4, 1927.
102. *Vitaminele.* Arhiva veterinară, 1932.
103. *Alimentaţia raţională a păsărilor.* Arhiva veterinară, 1933.
104. *Şoareci şi şobolani. Mijloace de distrugere.* Biblioteca cunoştinţe folositoare, 1933, nr. 50, seria A.
105. *Valoarea alimentară a laptelui.* Revista ştiinţelor medicale, 1933.
106. *Problema igenei laptelui.* Revista ştiinţelor medicale, 1934.
107. *Profesorul Ion Cantacuzino.* Natura, nr. 2, 1934.
108. *Lupta cu microbii.* Natura, **24**, 1935.
109. *Evoluţia ştiinţelor veterinare la noi şi aiurea.* Natura, **25**, 1936.
110. *Profesorul Paul Riegler.* Natura, **25**, 1936.
111. *Un model de organizare socială.* Natura, **26**, 1937.
112. *Laptele şi publicul consumator.* Revista laptelui, nr. 7—9, 1937.
113. *Compoziţia chimică a fiinţelor vieţuitoare după cunoştinţele actuale.* Natura, **26**, *5—6*, 1937.
114. *Cunoştinţele actuale asupra cancerului.* Revista ştiinţelor medicale, 1943.
115. *Din trecutul medicinei veterinare în ţara romînească.* Arhiva Veterinară, 1943.
116. *Un binefăcător al omenirii: Louis Pasteur.* Calendarul crescătorului, 1944.
117. *Pasteur* (după Dr. Roux). Traducere din limba franceză, 1944.
118. *Începuturile învăţămîntului veterinar în ţările romîne. Viaţa şi opera Doctorului C. Davila.* Arhiva Veterinară, 1944.
119. *Ceva despre microbi.* Revista laptelui, 1944.
120. *Microbii obişnuiţi din lapte.* Revista laptelui, 1944.
121. *Compoziţia chimică a materiei vii.* Natura, **34**, 1945.
122. *Importanţa infiniţilor mici chimici.* Arhiva veterinară, 1945.
123. *Laptele şi controlul lui igienic.* Broşură 162 p. (Premiată de Academia Romînă, 1945).
124. *Din istoricul scorbutului.* Natura, 1947.
125. *Controlul igenic al laptelui şi derivatelor sale.* Ed. agrosilvică, 164 p., 1959.

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: *viaţa ştiinţifică* — în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţa cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii romîni şi cei străini etc. *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc., se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Popovici nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R. P. R.

C. BODEA şi colab., **Tratat de biochimie vegetală**, vol. I, 747 + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice**, 339 p., 16 lei.

C. D. NENIŢESCU, I. P. CANTUNIARI şi I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice**, 96 p., 3,65 lei.

C. C. OPRESCU, **Infecţia cu micobacterii**, 224 p. + 5 pl., 12,20 lei.

R. PORTOCALĂ şi N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie şi inframicrobiologie**, 180 p., 9,90 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele**, 429 p., 22,80 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN şi N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor**, 284 p. +24 pl., 20 lei.

ST. CERC. BIOCHIMIE, Tomul 7, NR. 2, P. 147—312, BUCUREŞTI, IUNIE 1964

c. 1725 I. P. „Informaţia"

43816

Lei 12.—

F 1330

studii şi cercetări de biochimie

3

TOMUL 7
1964

EDITURA ACADEMIEI REPUBLICII POPULARE ROMÎNE
St. cerc. biochimie, tomul 7, nr. 3, p. 313—462, Bucureşti, octombrie 1964

COMITETUL DE REDACŢIE

Redactor responsabil:

ACADEMICIAN E. MACOVSCHI,

Redactor responsabil adjunct:

H. SLUŞANSCHI,

Membri:

S. OERIU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; EUGENIA SORU, membru corespondent al Academiei R.P.R.; M. MEZINCESCU; I. VASILESCU; TR. RĂDULESCU; VICTORIA ALEXANDRESCU,

Secretar de redacţie:

CECILIA ŞELARIU

Revista apare de 3 ori pe an.

Preţul unui abonament anual este de 36 lei.

În ţară abonamentele se fac la oficiile poştale, agenţiile poştale, factorii poştali şi difuzorii voluntari din întreprinderi şi instituţii.

Orice comandă din străinătate (numere izolate sau abonamente) se face prin: CARTIMEX, Căsuţa poştală 134 — 135, Bucureşti, R. P. Romînă, sau prin reprezentanţii săi din străinătate.

Manuscrisele, cărţile şi revistele pentru schimb, precum şi orice corespondenţă se vor trimite pe adresa **comitetului de redacţie** al revistei „Studii şi cercetări de biochimie"

ADRESA REDACŢIEI:

Bucureşti, *Str. Popovici nr. 20*
Raionul 30 Decembrie

STUDII ŞI CERCETĂRI DE

BIOCHIMIE

Tomul 7 (1964) nr. 3

SUMAR

Pag.

E. MACOVSCHI, S. RĂDULESCU, Introducerea şi răspîndirea peroxidazei din hrean în plantele de tomate 315

C. BODEA, T. LÁSZLÓ, Cercetări asupra unor caractere biochimice speciale ale porumbului. IV. Potenţialul redox al seminţelor unor hibrizi de porumb cu şi fără heterozis 321

C. BODEA, C. BILAUS, T. LÁSZLÓ, I. CĂBULEA, Cercetări asupra unor caractere biochimice speciale ale porumbului. V. Despre conţinutul în glutation redus şi oxidat al seminţelor şi plantulelor de porumb 325

E. REPCIUC, O. CILIEVICI, C. DRAGONCEA, Stabilirea concentraţiei de ADN în ficatul de şobolan 331

R. PORTOCALĂ, L. POPA, Tehnica de eluţie şi determinare în flux continuu a ARN fracţionat pe coloană de DEAE-celuloză 337

V. ALEXANDRESCU, Comportarea electroforetică a proteinelor solubile din germenii diferitelor soiuri de porumb 347

M. FURNICĂ, Relaţie între conţinutul în peroxizi lipidici şi activitatea catalazică a diferitelor ţesuturi (normale, tumorale, iradiate) 351

S. GHEŢIE, A. CIOBA, Dozarea pentozelor în lichidele biologice prin reacţia cu *o*-toluidină 359

V. GHEŢIE, L. BUZILĂ, Localizarea crioproteinelor în seminţe 367

C. MEDEŞAN, Nivelul fosfocreatinei după administrarea, respectiv imersarea muşchilor în soluţii de fosfaţi şi creatină 375

N. MOLDOVEANU, Acţiunea excitaţiilor electrice asupra nivelului compuşilor adenozinfosforici din muşchi 385

D. MOŢET, Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor din serul sanguin uman în urma denaturării termice. I. Cercetări imunoelectroforetice în gel de agaroză 393

E. PĂUNESCU, Reactivitatea biochimică şi imunologică a macrofagului histioid în tuberculoză. II. Diferenţe de compoziţie chimică între macrofagele cobaiului normal şi vaccinat B.C.G. 399

A. POPESCU-ŞTEFĂNESCU, E. SEREDIUC, Variaţiile fiziologice ale activităţii colinesterazice a plasmei la om 407

I. SZANTAI, T. HOLAN, A. FODOR, S. COTUL, Unele aspecte biochimice ale metabolismului metioninei în ulcerul duodenal şi gastric 417

Pag.

C. ŞELARIU, Studiul comparativ al antigenităţii proteinelor solubile din mitocondriile şi citoplasma creierului de şobolan 425

M. ŞERBAN, Aminoacizii liberi din creier în filogenie 433

GR. TURCU, V. VASILESCU, C. DIMOFTACHE, P. WEXLER, Studiu citochimic şi citospectrofotometric pe seria albă a şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P. II. Utilizarea acidului ascorbic ca radioprotector 441

CRONICA BIOCHIMIEI 453

RECENZIE 461

St. cerc. biochimie, tomul 7, nr. 3, p. 313 — 462, Bucureşti, octombrie 1964

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 315 – 319 (1964)

INTRODUCEREA ŞI RĂSPÎNDIREA PEROXIDAZEI DIN HREAN ÎN PLANTELE DE TOMATE*

ACADEMICIAN EUGEN MACOVSCHI şi SANDA RĂDULESCU

577.15.061

Rezumat. — Autorii introduc prin metoda capilară peroxidază extrasă din hrean în plantele despicate de tomate. Se constată că această enzimă se răspîndeşte în organismul vegetal, păstrîndu-şi activitatea specifică şi se inactivează pe măsură ce timpul trece.

Cercetările în problema interacţiunii dintre plante şi enzimele introduse în ele prezintă interes multilateral, deoarece pot contribui la stabilirea bazelor biochimice ale hibridării, la lămurirea interrelaţiilor dintre plante şi microorganismele patogene şi la precizarea relaţiilor dintre plante şi mediu, deschizînd totodată perspectiva găsirii unor posibilităţi de dirijare a metabolismului vegetal. Aceste cercetări necesită însă alegerea metodelor potrivite de investigaţie şi elucidarea prealabilă a unor comportări a enzimelor introduse în corpul plantelor. Astfel, trebuie recurs la o metodă care să permită introducerea continuă şi îndelungată a enzimelor în plante întregi, menţinute atît în cursul tratării cît şi după aceea în condiţiile normale de existenţă. Apoi, trebuie stabilite posibilităţile de comparare a activităţii enzimatice la plantele în care s-au introdus şi în care nu s-au introdus enzimele respective, avîndu-se în vedere că adesea variaţiile individuale mari ale acestor indici biochimici îngreuiază cercetarea implicînd efectuarea unui număr mare de analize. În fine, trebuie aflat, cel puţin în principiu, dacă enzimele introduse în plante se răspîndesc în corpul acestora sau rămîn reţinute de ţesuturile din imediata vecinătate a locului de introducere şi dacă îşi pot păstra activitatea măcar cîtva timp după ce au pătruns în organismul vegetal.

Numai după precizarea acestor aspecte ale cercetării experimentale, s-ar putea trece la investigaţii propriu-zise, şi aceasta cu atît mai mult cu cît unele date din literatură aduc informaţii preliminare promiţătoare. Aşa de exemplu, Kursanov şi şcoala lui au demonstrat că unele enzime, ca invertaza din drojdie, introduse prin vacuuminfiltraţie în frunzele diferitelor plante, îşi pot exercita aici acţiunea lor catalitică [1]; după Suhorukov, vacuuminfiltraţia ureazei, amilazei, invertazei şi pepsinei în Elodeea, duce la elaborarea de către această plantă a unor inhibitori spe-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba franceză.

cifici [2]; iar în privinţa posibilităţilor de translocare a enzimelor în plante, poate fi menţionată lucrarea lui Oparin şi Diacicov, după care amilaza poate migra din organele vegetative ale plantelor în cele de reproducere [3].

Pentru investigaţiile noastre am ales peroxidaza, datorită atît rolului ei în fenomenele de oxido-reducţie şi maturare a plantelor, cît şi faptului că această enzimă, uşor extractibilă din rădăcinile de hrean, este destul de stabilă şi activitatea ei poate fi determinată comod prin unele metode simple şi rapide. La extragerea acestei enzime am ţinut seama de reţetele date de Belozerski şi Proscuriakov [4], A. C. Maehly [5] şi alţi autori, aplicînd însă un procedeu simplificat, deoarece cercetările noastre nu necesitau enzima pură. Astfel, rădăcinile de hrean se curăţau, se spălau şi se transformau pe răzătoare de sticlă într-o pastă, la care se adăuga apă distilată în proporţie de 1 : 1; după păstrare în frigider timp de 24 ore, amestecul se storcea la 400 atm, cu o presă de mînă de tip Hafico, iar lichidul obţinut se centrifuga 30 de minute la 2 000 t/m; supernatantul limpede gălbui, se concentra la jumătate din volum prin ultrafiltrare la rece şi se purifica prin dializă, în pungi de celofan, tot la frigider, în decurs de alte 24 de ore.

Determinarea activităţii peroxidazei s-a făcut cu metoda Mihlin şi Bronovitkaia [6]. Extractul fiind prea activ, se dilua în prealabil în proporţie de 1/10 cu tampon acid acetic-acetat 0,01 M, la pH 4,7, luîndu-se pentru fiecare determinare 1,0 ml din soluţia finală a cărei activitate peroxidazică corespundea la 1,7—1,9 ml iod 0,01 N (diferenţa dintre volumul soluţiei de iod folosită pentru titrarea probei active a soluţiei finale şi a unei probe paralele inactivate în prealabil prin fierbere).

Pentru introducerea extractului peroxidazei în plante am recurs la metoda capilară [7], care constă în fixarea capătului unui fitil de bumbac într-un orificiu făcut în tulpina plantei, celălalt capăt fiind plasat într-un tub special, îndoit sub formă de U, în care se află extractul enzimei; extractul se urcă prin capilaritate prin fitil şi pătrunde în fasciculele conducătoare ale plantei. Cum însă se putea eventual obiecta că, pe măsura urcării prin fitil, soluţia enzimei îşi poate micşora concentraţia datorită adsorbţiei peroxidazei pe fibrele de bumbac ale fitilului şi că această adsorbţie ar putea fi cu atît mai probabilă cu cît concentraţia absolută a enzimei, chiar şi în extractele foarte active, este în general relativ mică, era necesară verificarea justeţei unei asemenea supoziţii. În acest scop, extractul de peroxidază a fost lăsat să curgă, prin sifonare printr-un fitil, dintr-un vas în altul (sifonare sub clopot de sticlă, pentru împiedicarea evaporării) şi apoi, după ce jumătate din extract a sifonat, a fost determinată activitatea peroxidazei în lichidele din ambele vase. Faptul că în lichidul trecut prin sifonare prin fitil, activitatea peroxidazică s-a dovedit a fi practic la fel cu cea din extractul iniţial, a demonstrat că, cel puţin în cazul peroxidazei, trecerea extractului prin fitilul de bumbac nu este însoţită de adsorbţia enzimei, ceea ce înseamnă că în condiţiile metodei capilare, extractul peroxidazei pătrunde în plantă fără a-şi pierde din activitate.

Pentru cercetări am folosit plante tinere de tomate hibride Bizon × ×10, de aproximativ 15 cm înălțime, aflate în ghivece, fitilul de 6 fire de ață de bumbac fiind introdus în tulpini la distanță de 5—6 cm de pămînt.

De la început s-a constatat că plantele menționate acceptă extractul de peroxidază și nu prezintă simptome de intoxicație nici după 14 zile de tratament, în decursul căruia absorb între 10—15 ml extract.

La cercetarea răspîndirii în plante a peroxidazei introduse în ele, trebuie însă să ținem seama de faptul cunoscut, că plantele de tomate prezintă o activitate peroxidazică proprie, care variază în limite largi nu numai de la o plantă la alta, ci și în diferitele părți ale aceleiași plante. În aceste condiții ar fi trebuit să efectuăm un mare număr de analize atît pe plante tratate cu peroxidază, cît și pe cele netratate, pentru ca valorificînd rezultatele analitice cu ajutorul calculului statistic, să putem stabili dacă între plantele tratate și cele netratate cu enzimă există vreo deosebire în ceea ce privește activitatea peroxidazică, adică dacă enzima introdusă în plante se răspîndește în corpul acestora. Pentru a evita acest mare număr de analize, am recurs la „metoda despicării" [8], ținînd seama de cercetările noastre anterioare care au dovedit că părțile simetrice ale plantelor despicate de tomate prezintă, practic, aceeași activitate peroxidazică. Comparînd deci activitatea peroxidazei în diferitele porțiuni din jumătatea plantei despicate, în care s-a introdus extractul de peroxidază (partea tratată), cu aceea din porțiunile simetrice ale celeilalte jumătăți a plantei rămasă netratată (partea martor), separată de prima printr-o fîșie subțire de material plastic impermeabil, se putea afla imediat dacă enzima introdusă a ajuns sau nu în părțile analizate.

Activitatea peroxidazică în diferite porțiuni ale plantelor am determinat-o tot după indicațiile date de Mihlin și Bronovițkaia [6]. Pentru aceasta se lua partea superioară a plantei, tăind tulpina cu 1—2 cm deasupra locului în care s-a introdus fitilul; fiecare dintre cele două jumătăți ale plantei despicate se cîntărea, se tăia mărunt și se mojara cu de 10 ori volumul soluției tampon acid acetic-acetat 0,01 M și pH 4,7. După 30 de minute, amestecul se centrifuga la 2 000 turații și se lua cîte 1,0 ml din supernatant pentru fiecare determinare a activității peroxidazice, procedîndu-se la fel ca în cazul soluției diluate a peroxidazei extrase din hrean.

Analizele, efectuate inițial numai pe frunze, la plantele care au absorbit în prealabil cîte 3 ml extract de peroxidază (rezultatele obținute pe una dintre plantele analizate sînt redate în tabela nr. 1), și apoi pe jumătăți de plante (tulpini împreună cu frunze) care au primit enzima timp de mai multe zile (tabela nr. 2, *A*), arată că activitatea peroxidazică în jumătățile tratate ale plantelor este mai mare decît în jumătățile netratate, ceea ce dovedește că peroxidaza introdusă nu este reținută de țesuturile din imediata vecinătate a locului de fixare a fitilului în tulpini, ci se răspîndește în organismul vegetal.

În fine, rămînea de stabilit dacă peroxidaza din hrean pătrunsă în plantele de tomate, își păstrează activitatea timp mai îndelungat. Pentru aceasta, plantele despicate au fost tratate timp de 6 zile cu extracte de

Tabela nr. 1

Activitatea peroxidazică a extractelor de frunze de tomate de la plantele despicate, după introducerea — într-una din jumătăţile tulpinii — de 3 ml extract de peroxidază de hrean. Activitatea peroxidazică este exprimată în ml soluţie iod n/100 raportată la 1,0 ml extract. Activitatea extractului de peroxidază din hrean era de 1,90

Frunzele analizate. Numărătoarea frunzelor s-a făcut de jos în sus, începînd de la nivelul la care a fost introdus fitilul în tulpina plantei	Activitatea peroxidazică a frunzelor din :		$\Delta = P_1 - P_2$
	partea plantei în care s-a introdus peroxidaza din hrean (P_1)	partea plantei în care nu s-a introdus enzima (P_2)	
A II-a frunză	1,32	0,80	0,52
I-a frunză	1,52	0,85	0,67

Tabela nr. 2

Activitatea peroxidazică a extractelor obţinute din cele două jumătăţi ale plantelor (tomate) despicate, într-una din ele fiind introdus extractul peroxidazei de hrean. Activitatea peroxidazică este exprimată în ml soluţie iod n/100, raportată la ml extract. Activitatea extractului peroxidazei din hrean era de 1,83

Planta nr.	Data	Durata introducerii extractului de peroxidază (zile)	Timpul trecut de la întreruperea introducerii enzimei în plantă pînă la efectuarea analizelor (zile)	Cantitatea extractului peroxidazei pătruns în plante (ml)	Activitatea peroxidazică la :		$\Delta = P_1 - P_2$
					partea plantei în care s-a introdus enzima P_1	partea plantei în care nu s-a introdus enzima P_2	
		A					
1	mai	2	0	1,3	0,29	0,18	0,11
2	1963	4	0	2,6	0,25	0,16	0,09
3		6	0	2,6	0,35	0,22	0,13
4	mai	4	0	3,0	0,78	0,52	0,26
5	1964	4	0	2,7	0,49	0,35	0,14
6		4	0	3,5	0,90	0,62	0,28
		B					
7	mai	6	2	6,2	0,30	0,20	0,10
8	1963	6	5	5,9	0,38	0,38	0,00
9		6	7	7,0	0,31	0,30	0,01
10	mai	6	2	5,2	0,35	0,23	0,12
11	1964	6	2	6,0	0,65	0,41	0,24
12		6	5	7,5	0,80	0,82	0,02
13			5	6,7	0,30	0,29	0,01

peroxidază şi apoi, după 2, 5 şi 7 zile de la întreruperea tratamentului, s-a determinat în ele activitatea acestei enzime. Din unele date experimentale prezentate în tabela nr. 2 *B*, rezultă că după 2 zile de la întreruperea introducerii peroxidazei în plante, părţile tratate prezintă încă o activitate peroxidazică mai intensă decît cele netratate, dar că această deosebire nu se mai manifestă după un timp mai îndelungat (5—7 zile). Înseamnă că, pe măsură ce timpul trece, peroxidaza din hrean pătrunsă în plantele de tomate devine inactivă.

Din materialul experimental prezentat în această lucrare, se desprind următoarele concluzii : metoda capilară se pretează pentru introducerea în plante a extractelor care conţin peroxidază ; metoda despicării este indicată pentru cercetări în legătură cu răspîndirea în plante a peroxidazei ce se introduce în ele ; peroxidaza din hrean introdusă în tulpinile plantelor de tomate, se răspîndeşte în acestea, păstrîndu-şi activitatea specifică ; pe măsura trecerii timpului, peroxidaza de hrean pătrunsă în plantele de tomate devine inactivă.

Este probabil că cele constatate mai sus sînt valabile şi în cazul altor enzime şi, prin urmare, procedeul propus poate fi folosit ca punct de plecare pentru cercetarea sistematică a interacţiunii dintre plante şi enzimele introduse în ele.

Prezentată la redacţie
la 23 iunie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

1. A. L. KURSANOV, E. ISAEVA, V. POTAPENKO, *Primenenie metoda vacuum infiltraţii dleacolicestvenogo opredelenia sintetiziruiuşcego i hidroliziruiuşkego deistvia invertazi v jivih rastitelnih tcaniah*, Biohimia, **1**, *3*, 269 (1936).
2. K. T. SUHORUKOV, R. V. GLAZKOVA. *Reakţia rastenia navvdennie fermenti*, Trudî Instituta fiziologii rastenii imeni K. A. Timiriazeva, **6**, *2*, 260 (1949).
3. A. I. OPARIN, N. N. DIATSCHKOV, *Über die Fermentbildung in reifenden Samen.*, Biochem. Ztschr., **196**, 1 (1928).
4. A. N. BELOZERSKI, N. I. PROSCURIACOV, *Practicescoe rukovodstvo po biohimii rastenii*, Moskova, 1951, p. 287.
5. A. C. MAEHLY, Plant Peroxidase, în S. P. COLOWICK şi N. O. KAPLAN, *Methods in Enzymology*, vol. II, Acad. Press Inc., New York, 1955, p. 803.
6. D. M. MIHLIN, Z. S. BRONOVITKAIA, în *„Metodi biohimicescogo issledovania rastenii"*, Izl. selsk. 1. t., Moscova-Leningrad, 1952, p. 65.
7. E. MACOVSCHI, *Metoda capilară pentru introducerea compuşilor chimici şi produşilor biologici în cazul plantelor*, Com. Acad. R.P.R., **8**, 183 (1958). *De Verwendung der Kapillarmethode zur Einführung chemischer und biochemischer Stoffe in den Pflanzen körper*, Preslia, **30**, 252 (1958).
8. E. MACOVSCHI, LILICA BOTOŞĂNEANU, *Metoda despicării pentru cercetări biochimice comparative la plante*, St. cerc. Biochim., **6**, *4*, 485 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 321 – 323, (1964)

CERCETĂRI ASUPRA UNOR CARACTERE BIOCHIMICE SPECIALE ALE PORUMBULUI

IV. POTENȚIALUL REDOX AL SEMINȚELOR UNOR HIBRIZI DE PORUMB CU ȘI FĂRĂ HETEROZIS*

CORNEL BODEA și TIBERIU LÁSZLÓ

633.15-1.523 : 575.125

Rezumat. — S-a determinat potențialul redox (*Eh*) al unor semințe de hibrizi simpli de porumb, în comparație cu cel al liniilor parentale consangvinizate, examinîndu-se atît o serie de 30 de combinații hibride (dintre care 24 prezentau fenomenul de heterozis și 6 erau lipsite de heterozis), cît și cele 15 linii parentale din care au fost obținuți hibrizii.

S-a constatat că potențialul redox al semințelor hibrizilor simpli cu heterozis este, în general, mai scăzut decît cel al liniilor parentale. Cu toate că 20% din cazurile cercetate se abat de la această regulă, există perspective ca determinările de *Eh* să permită o depistare limitată a semințelor cu heterozis, în sensul că un *Eh* mai scăzut decît cel al liniilor parentale poate indica existența fenomenului de heterozis.

În cercetări anterioare [1] am constatat că există diferențe apreciabile în valorile potențialului redox al semințelor diferitelor soiuri de porumb.

Folosind principial aceeași tehnică experimentală, cercetările au fost extinse în lucrarea de față asupra semințelor unor hibrizi simpli de porumb, cu și fără heterozis. S-a determinat potențialul redox al semințelor hibride în comparație cu cel al semințelor liniilor consangvinizate parentale, pentru a se vedea dacă se poate găsi o corelație între această caracteristică a semințelor și fenomenul de heterozis.

Din acest punct de vedere, prezentele cercetări se încadrează în problema mai largă a cunoașterii cauzelor care determină fenomenul de heterozis, abordată de către noi în cercetări asupra corelației dintre conținutul în acizi nucleici și manifestarea fenomenului de heterozis [2].

În cercetări asupra potențialului redox la frunzele și tulpinile de porumb hibrid în comparație cu liniile parentale, efectuate de către M. S. Rubțova [3], s-a constatat la hibrizi un potențial redox mai scăzut decît la liniile parentale, iar scăderea a fost atribuită unei activități mai reduse a enzimelor oxidative.

În cercetările prezente am lucrat cu semințele a 24 de hibrizi simpli, care prezintă fenomenul de heterozis, 6 hibrizi fără heterozis și cu liniile

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, *3* (1964), în limba germană.

consangvinizate (în număr de 15) din combinaţia cărora s-au obţinut aceşti hibrizi. Seminţele au provenit din recoltele anilor 1960, 1961 şi 1962.

S-a lucrat cu hibrizi şi linii parentale consangvinizate de porumb obţinute de la Staţia experimentală agricolă Turda.

Metodei de determinare a potenţialului redox descrise în lucrarea anterioară [1] i s-au adus unele modificări, care au permis obţinerea unei reproductibilităţi mai bune a rezultatelor.

Electrozii de platină folosiţi au fost verificaţi şi selecţionaţi în experienţe preliminare, iar înainte de începerea determinărilor au fost trataţi timp de 15 min cu acid sulfuric concentrat.

Pentru prepararea probelor s-au folosit 10 g de făină proaspăt măcinată şi 60 ml de apă distilată, liberă de bioxid de carbon. Înregistrarea rezultatului s-a făcut la 1 oră după introducerea electrozilor de platină în probă. În tot cursul determinării proba a fost agitată cu ajutorul unui agitator magnetic.

Din tabela nr. 1 rezultă următoarele:

La seminţele hibride cu heterozis, potenţialul redox *Eh* este, în 19 din cele 24 de cazuri cercetate, mai mic decît cel al liniilor parentale, în 2

Tabela nr. 1

Potenţialul redox (Eh) al seminţelor de porumb (hibrizi şi linii parentale)

Combinaţia hibridă	*Eh* (în mV)			pH			Recolta	Obs.
	Linia		Hibrid	Linia		Hibrid		
	mamă	tată		mamă	tată			
182 B × M13R Tms	405	422	404	6,4	6,1	6,5	1960	cu heterozis
153R × 37A	410	425	392	6,2	6,1	6,3	„	
153R × 37A	407	422	329	6,2	6,3	6,3	1961	„
153R × VIR40	407	397	383	6,2	6,3	6,0	„	„
A344 × 182B	431	450	418	6,0	5,9	6,3	„	„
A344 × 37A	431	422	429	6,0	6,3	5,9	„	„
A344 × 37ARf	431	403	421	6,0	6,3	5,8	„	„
A344 × W9	431	437	324	6,0	6,1	6,3	„	„
A344 × 37ARf	431	391	357	6,0	6,0	6,1	„	„
A111 × 153R	425	407	346	6,3	6,2	6,3	„	„
A111 × A344	425	431	374	6,3	6,0	6,3	„	„
WA162 × 182B	392	450	360	6,1	5,9	6,3	„	„
WA162 × 37A	392	422	384	6,1	6,3	6,4	„	„
WA162 × 153R	392	407	398	6,1	6,2	6,2	„	„
W9 × A344	437	431	381	6,1	6,0	6,2	„	„
W9 × 153R	437	407	432	6,1	6,2	5,9	1962	„
W9 × 37ARf	437	403	313	6,1	6,3	6,3	1961	„
W9 × M13RRf	437	399	356	6,1	6,3	6,4	„	„
37A × 182B	403	450	342	6,3	5,9	6,4	„	„
37A × M13R	403	386	320	6,3	6,3	6,2	„	„
182B × W9	450	437	395	5,9	6,1	6,0	„	„
182B × 153R	450	407	398	5,9	6,2	6,6	„	„
182B × M13RRf	450	399	311	5,9	6,3	6,4	„	„
182B × 37A	450	422	405	5,9	6,3	5,6	„	„
W9 × WA19	437	412	412	6,1	6,3	6,2	„	fără heterozis
WA19 × W9	412	437	412	6,3	6,1	6,4	„	„
WA162 × W9	392	437	392	6,1	6,1	5,8	„	„
A344 × 153R	431	407	429	6,0	6,2	6,0	1960	„
A344 × 153R	401	394	398	6,2	6,2	5,9	1962	„
W9 × WA19	399	419	398	6,0	5,9	6,0	„	„

cazuri aproximativ egal ($\pm$ 2 mV) cu *Eh*-ul liniei-mamă și în 3 cazuri intermediar între *Eh*-urile liniilor parentale.

Eh-ul liniei-mamă a fost în 10 cazuri mai mic și în 14 cazuri mai mare decît cel al liniei-tată.

La semințele hibride fără heterozis, *Eh*-ul are o valoare intermediară față de valorile găsite la liniile parentale sau este aproximativ egal cu cel al uneia dintre liniile parentale, în general cu valoare ceva mai mică. În nici unul dintre cazurile cercetate *Eh*-ul semințelor hibride fără heterozis nu a fost mai mic decît al liniilor parentale.

Eh-ul liniei-mamă a fost în 3 cazuri mai mic și în 3 cazuri mai mare decît cel al liniei-tată.

Aceste rezultate arată că potențialul redox al semințelor hibrizilor simpli de porumb care manifestă fenomenul de heterozis este în general mai scăzut decît al liniilor parentale. Cu toate că circa 20% din cazurile cercetate se abat de la această regulă generală, există perspective ca determinările de *Eh* să permită o depistare limitată a semințelor hibride cu heterozis, în sensul că un *Eh* mai scăzut decît al liniilor parentale ar indica existența fenomenului de heterozis, în timp ce un *Eh* mai mare decît al liniilor parentale, intermediar sau aproximativ egal cu al uneia dintre liniile parentale, n-ar putea da un răspuns sigur la întrebarea dacă hibridul va prezenta sau nu heterozis.

Prezentată la redacție
la 27 aprilie 1964

Catedra de chimie și biochimie a Institutului agronomic „Dr. Petru Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. BODEA, T. LÁSZLÓ, St. cerc. biochim., *3*, 351 (1962).
2. C. BODEA, D. OȘIANU, I. CĂBULEA, St. cerc. biochim., *4*, 491 (1963).
3. M. S. RUBȚOVA, Fiziologhiia rastenii, *6*, 695 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 325 – 330 (1964)

CERCETĂRI ASUPRA UNOR CARACTERE BIOCHIMICE SPECIALE ALE PORUMBULUI

V. DESPRE CONȚINUTUL ÎN GLUTATION REDUS ȘI OXIDAT AL SEMINȚELOR ȘI PLANTULELOR DE PORUMB*

CORNEL BODEA, CORINA BILAUS, TIBERIU LÁSZLÓ și ION CĂBULEA

633.15—1.523 : 575.125

Rezumat. — S-a determinat conținutul în glutation redus și oxidat al semințelor la 33 de hibrizi de porumb, precum și la liniile parentale ale acestora, urmărind în cîteva cazuri dinamica glutationului în timpul germinației.

S-a constatat că glutationul conținut variază în limite largi, fiind cuprins, la probele analizate, între 6,9 și 37,1 mg glutation redus și între 5,6 și 29,6 mg glutation oxidat, la 100 g substanță. Raportul dintre forma redusă și cea oxidată se situează între valorile 0,32 și 3,91, la majoritatea probelor depășind valoarea 1.

În timpul germinației, se observă o creștere generală a glutationului redus, o ușoară scădere, urmată de creștere a glutationului oxidat și o creștere urmată de scădere a raportului între cele două forme.

Într-o lucrare anterioară [1] am studiat conținutul de glutation redus al semințelor diferitelor soiuri și hibrizi dubli de porumb.

Întrucît în literatura de specialitate se găsesc indicații că raportul dintre grupările tiolice și disulfidice ar fi corelat cu unele procese fiziologice [2], am extins cercetările și asupra formei oxidate a glutationului. Ni s-a părut în primul rînd interesant de studiat dacă se poate găsi o corelație între fenomenul de heterozis la porumb și raportul dintre forma redusă și oxidată a glutationului.

MATERIAL ȘI METODE

Au fost studiați 33 de hibrizi de porumb, cu și fără heterozis, precum și liniile parentale consangvinizate ale acestora, din recoltele anilor 1960, 1961 și 1962, cultivate la Stația agricolă experimentală Turda. S-a determinat conținutul de glutation redus și oxidat al semințelor și s-a urmărit în cîteva cazuri dinamica glutationului în timpul germinației.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, *3* (1964), în limba germană.

Glutationul a fost determinat iodometric, forma redusă direct, iar forma oxidată prin diferenţă, după reducere. Pentru reducerea glutationului se recomandă în literatură mai multe metode, dintre care cele mai mult aplicate sînt reducerea cu pulbere de zinc în mediu acid [3], cu hidrogen sulfurat [4] şi reducerea electrolitică [5].

În cazul extractelor din seminţele şi plantulele de porumb, am stabilit printr-o serie de experimentări că reducerea cu zinc şi cu hidrogen sulfurat nu dă valori reproductibile. În schimb, am obţinut rezultate satisfăcătoare prin metoda electrolitică, pe care am aplicat-o în determinările noastre.

Dozarea iodometrică a glutationului s-a făcut în extract de acid metafosforic 5%, cu dozarea concomitentă a acidului ascorbic prin metoda cu diclorfenol-indofenol [6]. S-a întrebuinţat făina proaspăt obţinută prin măcinarea seminţelor. Pentru a evita o eventuală oxidare a glutationului în contact cu aerul, cîntărirea s-a făcut direct în vasul tarat care conţinea 20 ml acid metafosforic.

Deoarece seminţele nu conţin acid ascorbic şi nici alte substanţe reducătoare de iod în mediu acid [1], valoarea obţinută prin titrarea iodometrică corespunde glutationului redus.

La dozarea glutationului din plantule, materialul a fost sfărîmat în mojar, cu nisip, în prezenţă de acid metafosforic. În continuare, s-a procedat ca şi în cazul seminţelor, determinîndu-se însă şi acidul ascorbic, valoarea corespunzătoare acestuia fiind scăzută din total.

Reducerea glutationului oxidat s-a efectuat după metoda Dohan şi Woodward [7], adaptată la condiţiile noastre de lucru. Ca electrolit s-a folosit acid metafosforic 5%. Tensiunea curentului continuu a fost de 20 V, densitatea curentului 2,41 mA/cm^2, iar durata reducerii 10 min. S-a întrebuinţat pentru reducere un volum de 12 ml, din care s-au luat pentru titrare 10 ml.

Urmărirea variaţiilor în timpul germinaţiei. În acest scop s-au pus la germinat 60 de seminţe, cîntărite de trei ori, avînd fiecare aproximativ aceeaşi greutate. După 2, 4, 6 şi 8 zile s-au luat din fiecare probă cîte 15 boabe pentru determinarea umidităţii, a glutationului redus şi oxidat, precum şi a acidului ascorbic.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Conţinutul de glutation redus şi oxidat al seminţelor, precum şi raportul dintre aceste două forme sînt redate în tabelele nr. 1 şi 2.

Din analiza acestor date rezultă că glutationul redus şi oxidat variază în limite foarte largi, şi anume între 6,9 şi 37,1 mg % la forma redusă şi între 5,6 şi 29,6 mg % la forma oxidată. Raportul dintre forma redusă şi cea oxidată se situează între valorile 0,32 şi 3,91. La majoritatea probelor, această valoare este supraunitară, ceea ce arată predominanţa formei reduse.

Variaţii în conţinutul de glutation se observă şi între probele provenite din ani diferiţi. Astfel, urmînd aceeaşi linie sau hibrid, se constată

că valorile cele mai mici se găsesc în anul 1960 și cele mai ridicate în anul 1962. Aceste variații pot fi corelate cu condițiile de climat din perioada de vegetație a porumbului în anii respectivi (redate în tabela nr. 3).

Tabela nr. 1

Conținutul în glutation al semințelor de porumb. Linii*

Linia	Anul recoltării	Glutation		
		redus	oxidat	raportul red./oxid.
A 344	1960	13,7	14,7	0,93
W A 19	„	13,4	15,1	0,89
W 9	„	23,9	17,9	1,34
153 R	„	26,4	28,7	0,92
37 A	„	22,7	12,2	1,87
182 B	„	30,5	13,3	2,28
M 13 R	„	16,9	18,8	0,89
V I R 40	„	15,0	20,7	0,72
V I R 43	„	15,7	25,3	0,62
A 344	1961	26,2	10,6	2,47
A 111	„	20,9	19,9	1,05
W A 162	„	14,6	13,9	1,05
W 9	„	24,0	14,5	1,66
153 R	„	30,5	20,5	1,49
M 13 R	„	21,8	13,3	1,64
37 A	„	20,2	21,0	0,96
37 A Rf	„	22,9	12,3	1,86
182 B	„	24,0	15,6	1,54
A 344	1962	37,0	12,0	3,08
W A 19	„	32,4	9,9	3,27
W 9	„	33,3	11,2	2,93
153 R	„	33,5	10,1	3,33
37 A Rf	„	30,8	12,3	2,50
182 B	„	33,2	8,5	3,91

* Glutationul este exprimat în mg la 100 g făină. Deoarece umiditatea a fost la toate probele circa 10%, conținutul în glutation nu s-a raportat la substanța uscată.

Se confirmă deci cele semnalate într-o lucrare anterioară [1], și anume că semințele porumbului cultivat în condiții de temperatură mai ridicată și umiditate mai scăzută au un conținut mai ridicat de glutation redus.

Glutationul oxidat prezintă variații mai mici și de obicei în sens contrar, de aceea raportul dintre cele două forme are valori minime în 1960 și maxime în 1962.

Între hibrizi și liniile parentale, precum și între hibrizii cu și fără heterozis, nu au putut fi semnalate deosebiri principale nici în ceea ce privește conținutul de glutation redus și oxidat, nici în ceea ce privește raportul dintre cele două forme.

Tabela nr. 2

Conținutul în glutation al semințelor de porumb. Hibrizi*

Hibridul	Anul recoltării	Glutation			Obs.
		redus	oxidat	raportul red./oxid.	
A 344×153 R	1960	6,9	21,3	0,32	fără heterozis
A 344×37 A	,,	14,7	18,7	0,79	cu heterozis
A344×182B	,,	10,6	15,1	0,70	,,
W A 19 153 R	,,	24,4	14,4	1,70	,,
W A 19×182 B	,,	14,9	15,5	0,96	,,
W 9×W A 19	,,	17,0	19,9	0,85	fără heterozis
W 9×153 R	,,	16,6	13,6	1,22	cu heterozis
W 9×182 B	,,	14,4	21,5	0,67	,,
153 R×37 A	,,	26,4	19,8	1,33	,,
182 B×153 R	,,	13,8	14,8	0,93	,,
182 B×M 13 R	,,	23,1	14,0	1,66	,,
V I R 40×V I R 43	,,	14,8	29,6	0,50	,,
A 344×37 A Rf	1961	19,5	10,8	1,81	,,
A 111×A 344	,,	20,2	12,3	1,64	,,
A 111×153 R	,,	21,3	27,4	0,78	,,
W A 162×W 9	,,	10,5	11,9	0,88	fără heterozis
W A 162×153 R	,,	19,6	18,7	1,05	cu heterozis
W A 162×37 A	,,	14,9	19,7	0,76	,,
W A 162×182 B	,,	17,2	21,1	0,81	,,
W 9×A 344	,,	16,3	9,9	1,64	,,
37 A Rf×M 13 R	,,	18,5	11,3	1,63	,,
182 B×W 9	,,	18,8	15,6	1,20	,,
182 B×37 A	,,	15,1	13,2	1,14	,,
182 B×37 A Rf	,,	19,2	11,5	1,67	,,
A 344×153 R	1962	17,2	5,6	3,07	fără heterozis
A 344×37 A Rf	,,	27,9	7,3	3,82	cu heterozis
A 344×182 B	,,	32,1	16,2	1,90	,,
W 9×W A 19	,,	32,3	16,6	1,95	fără heterozis
W 9×153 R	,,	37,1	10,4	3,57	cu heterozis
W 9×182 B	,,	32,7	11,3	2,88	,,
153R×37 A Rf	,,	34,7	18,2	1,94	,,
182 B×153 R	,,	32,0	16,8	1,90	,,
182 B×37 A Rf	,,	33,0	10,7	3,08	,,

* Glutationul este exprimat în mg la 100 g făină. Deoarece umiditatea a fost la toate probele de circa 10%, conținutul în glutation nu s-a raportat la substanța uscată.

Tabela nr. 3

Caracterele climei în anii 1960, 1961 și 1962, pe timpul perioadei de vegetație a porumbului

Caracterele climei	Anul		
	1960	1961	1962
Suma precipitațiilor	344 mm	228 mm	213 mm
Constanta termică	2 727°C	2 928°C	2 897°C

Tabela nr. 4

Variația conținutului în glutation în timpul germinației*

Proba	Conținutul în glutation, în mg/100 g substanță uscată														
	în boabe			după 2 zile de germinație			după 4 zile de germinație			după 6 zile de germinație			după 8 zile de germinație		
	forma redusă	forma oxidată	red./ oxid.	forma redusă	forma oxidată	red./ oxid.	forma redusă	forma oxidată	red./ oxid.	forma redusă	forma oxidată	red./ oxid.	forma redusă	forma oxidată	red./ oxid.
Linia 153 R	29,3	31,9	0,91	41,4	9,5	4,36	72,2	37,6	1,92	84,4	93,6	0,90	110,4	142,1	0,77
Linia 37 A	25,2	13,5	1,87	39,3	10,0	3,93	72,0	83,8	0,86	95,4	142,9	0,66	114,7	156,5	0,73
Hibridul 153R × 37A	29,3	22,0	1,33	100,9	26,7	3,78	115,8	142,3	0,81	220,8	186,1	1,19	151,3	62,3	2,43
Linia 128 B	33,7	14,8	2,28	40,0	28,6	1,39	61,7	30,1	2,05	91,9	110,0	0,84	156,1	161,2	0,97
Linia 322	18,8	21,0	0,89	24,8	22,4	1,11	48,5	26,9	1,80	52,0	44,5	1,15	51,5	82,5	0,62
Hibridul 182 B × 322	25,7	15,5	1,66	40,5	21,3	1,90	60,6	63,0	0,96	59,8	69,8	0,86	64,5	123,6	0,52
Linia V I R 40	16,7	23,0	0,72	35,6	17,8	2,03	49,8	23,6	2,11	75,0	81,1	0,92	71,6	71,1	1,01
Linia V I R 43	17,4	28,1	0,62	54,8	22,6	2,42	99,4	52,4	1,89	119,5	70,5	1,69	121,3	65,8	1,84
Hibridul VIR 40 × VIR 43	16,4	32,9	0,50	43,4	26,3	1,65	83,4	48,2	1,74	93,2	94,6	0,99	94,7	55,2	1,70

* Glutationul este exprimat în mg/100 g substanță uscată.

Rezultatele privitoare la dinamica glutationului în timpul germinaţiei sînt redate în tabela nr. 4, din care se constată o creştere generală a glutationului redus, o scădere urmată de o creştere a glutationului oxidat şi o creştere urmată de scăderea raportului dintre cele două forme.

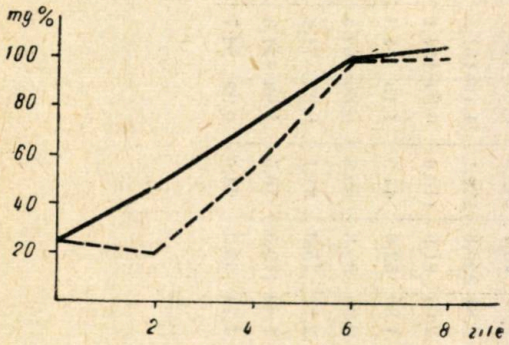


Fig. 1. — Variaţia conţinutului în glutation redus şi oxidat în timpul germinaţiei (în mg/100 g substanţă uscată).
———— glutation redus;
– – – – – – glutation oxidat.

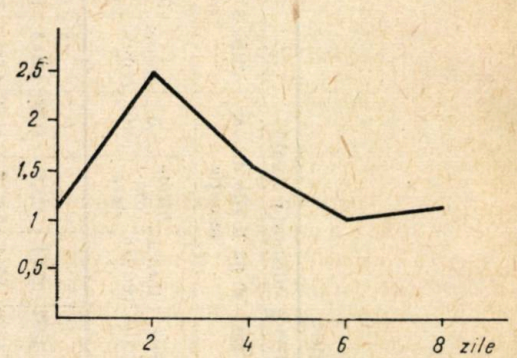


Fig. 2. — Variaţia raportului glutation redus/glutation oxidat în timpul germinaţiei.

Nu se observă deosebiri principale între hibrizi şi liniile parentale, ceea ce permite reprezentarea dinamicii medii a celor 9 probe (3 hibrizi şi 6 linii parentale) în figurile 1 şi 2.

Din figura 1 reiese o creştere mai accentuată a glutationului redus în primele 6 zile de germinaţie şi o uşoară scădere a glutationului oxidat în primele 2 zile, după care urmează o creştere accentuată pînă în ziua a 6-a, iar din figura 2 reiese o creştere a raportului glutation redus/glutation oxidat în primele zile.

Creşterea conţinutului de glutation în timpul germinaţiei confirmă că acesta constituie şi în cazul porumbului un factor activ în procesele metabolice.

Prezentată la redacţie
la 27 aprilie 1964

Catedra de chimie şi biochimie
a Institutului agronomic
„Dr. P. Groza", Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. C. BODEA, C. BILAUS, St. cerc. biochim., *3*, 339 (1961).
2. C. I. PARHON, S. OERIU, St. cerc. biochim., *1*, 359 (1959).
3. I. BACH, J. Biol. Chem., **97**, 472 (1932).
4. P. THOMAS, *Manuel de biochimie*, Masson, Paris, 1946.
5. S. K. BHATTACHARYA, J. S. ROBSON, C. P. STEWART, Biochem., J., **60**, 696 (1955).
6. * * * *Biohimia zerna*, Izd. Akad. Nauk SSSR, 1951.
7. J. S. DOHAN, G. E. WOODWARD, J. Biol. Chem., **129**, 393 (1939).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 331 – 336 (1964)

STABILIREA CONCENTRAȚIEI DE ADN ÎN FICATUL DE ȘOBOLAN*

EMIL REPCIUC, OLGA CILIEVICI și CORNELIA DRAGONCEA

612.398.145.1

Rezumat. — Cercetînd variația de ADN din ficatul de șobolan Wistar în 24 de ore și prelevînd pentru dozare de ADN și glicogen ficatul uscat și degresat a 5 animale la fiecare 2 ore (în total deci 60 de animale), s-a constatat o variație a ADN inversă cu a glicogenului. Pentru a decide dacă această variație de ADN nu este un efect al diluției prin glicogen a masei celulare uscate și degresate, s-a calculat prin metoda celor mai mici pătrate valoarea concentrației presupuse constante a ADN în funcție de efectul presupus de diluție al glicogenului. S-a testat valabilitatea constantei astfel calculate cu testul „t" și s-a confirmat ipoteza că fluctuația circadienă a ADN nu este reală, ci este doar un efect al variabilității „balastului" de glicogen.

Problema variației acizilor nucleici în 24 de ore are o însemnată valoare teoretică, întrucît demonstrarea unei variații diurne a acizilor dezoxiribonucleici în particular ar dovedi existența unui ADN exclusiv metabolic, care apare și dispare o dată cu nevoile metabolice. Asemenea situație nu contrazice funcția genetică a ADN, dar ar pune într-o lumină nouă funcția metabolică a acestuia **.

Pentru a elucida problema aceasta, trebuie să raportăm ADN la țesutul eliberat de balast, întrucît variația acestuia influențează negreșit concentrația ADN în țesut. Pentru apă și lipide, lucrul acesta se face curent. Ne propunem să dovedim că pentru ficatul de șobolan cel puțin, glicogenul constituie și el balast.

MATERIAL ȘI METODĂ

Pentru a nu interfera cu fenomenele de mitoză în ficat, am ales animale cu greutatea mai mare sau cel puțin egală cu 150 g. Se știe că asemenea animale prezintă mitoze sub 1/100 000 de celule, iar dincolo de 170 g, unde se situează majoritatea animalelor noastre, mitozele sînt excepționale. De asemenea dincolo de această greutate ploidia și binucleatele rămîn și ele constante (F. Doljanski, 1960). Animalele au fost sacrificate din 2 în 2 ore, în decursul unui ciclu de 24 de ore, fiecare lot sacrificat fiind alcătuit din 5 animale; au fost, prin

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, 3 (1964) în limba franceză.

** Nu am găsit în literatură date asupra variației diurne a ADN, dar *v. Mayersbach*, într-o conversație la congresul de histochimie de la Varșovia (1963), ne-a afirmat că ADN din ficat variază într-un ciclu diurn, uneori de la simplu la triplu. Acest lucru ar reieși din confruntarea datelor histochimice cu cele biochimice, obținute pe țesutul uscat și degresat.

urmare, utilizate 60 de animale. Ficatul era prelevat pe gheaţă, tratat cu acetonă-eter la rece, uscat şi întrebuinţat pentru dozarea ADN după tehnica *Levy-Webbs* (1955) şi pentru dozarea glicogenului după *Harrison* (difenilamină). Datele obţinute au fost prelucrate statistic, iar pe tabelele anexate dispersia a fost reprezentată prin rădăcina pătrată a varianţei, adică prin devierea standard.

REZULTATE

Dăm în tabela nr. 1 rezultatele dozărilor de ADN şi glicogen, în mg substanţă la 100 mg ţesut uscat şi degresat.

Tabela nr. 1

Concentraţia în ADN şi glicogen din ficatul de şobolan în decurs de 24 de ore

Greutate (în g)	ADN	Glicogen		ADN	Glicogen
155	1,525	13 ora 2	Media	1,395	8,4
155	1,277	8	D.S.	0,046	0,82
230	1,467	10			
150	1,395	10			
165	1,312	11			
		orele 4			
155	1,277	16	Media	1,247	14,8
195	1,312	16	D.S.	0,027	0,74
155	1,277	13			
150	1,165	13			
150	1,205	16			
		orele 6			
160	1,525	11	Media	1,374	12,6
155	1,395	17	D.S.	0,046	1,7
195	1,277	16			
175	1,277	11			
150	1,395	8			
		orele 8	Media	1,839	5,6
190	2,025	4	D.S.	0,114	1,02
240	1,525	7			
240	1,595	9			
230	2,025	4			
200	2,025	4			
		orele 10	Media	1,811	3,0
190	1,880	5	D.S.	0,028	0,68
205	1,765	2			
205	1,880	4			
290	1,765	2			
220	1,765	2			
		orele 12			
220	1,672	5	Media	1,769	3,8
230	1,765	4	D.S.	0,033	0,5
220	1,880	2			
210	1,765	4			
230	1,765	4			
		orele 14			
215	1,525	5	Media	1,583	4,4
285	1,880	4	D.S.	0,094	0,74
310	1,672	7			
310	1,525	3			
170	1,312	3			

Tabela nr. 1 (continuare)

Greutate (în g)	ADN	Glicogen		ADN	Glicogen
		orele 16			
165	1,672	12	Media	1,624	6,8
165	1,525	4	D.S.	0,105	1,46
190	1,277	8			
160	1,880	5			
210	1,765	5			
		orele 18			
200	1,277	16	Media	1,365	10,0
200	1,277	13	D.S.	0,05	1,98
200	1,467	8			
200	1,277	8			
210	1,525	5			
		orele 20			
210	1,312	14	Media	1,205	12,0
210	1,175	11	D.S.	0,045	0,84
210	1,312	10			
210	1,112	10			
210	1,112	11			
		orele 22			
160	1,277	10	Media	1,386	12,0
160	1,672	11	D.S.	0,083	1,76
160	1,277	16			
220	1,277	7			
165	1,240	16			
		orele 24			
190	1,525	17	Media	1,395	16,0
185	1,277	16	D.S.	0,046	0,88
180	1,395	17			
155	1,312	13			
140	1,467	17			

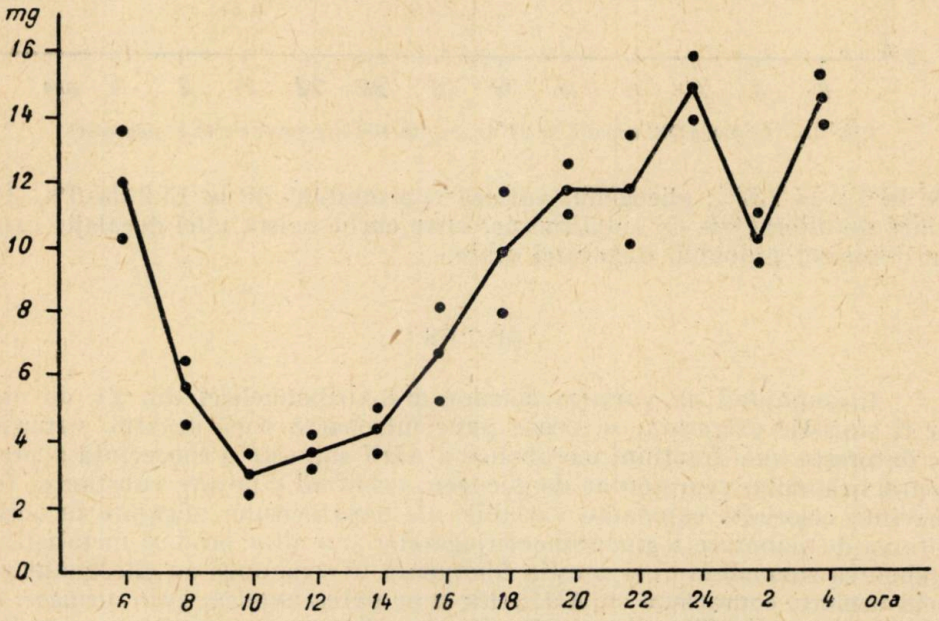


Fig. 1. — Curba glicogenului hepatic în 24 de ore (în 100 mg ţesut uscat şi degresat).

Din examinarea tabelei şi a graficelor (fig. 1 şi 2) rezultă că în 24 de ore variabilitatea ADN raportată la ţesut uscat şi degresat este inversă variaţiilor de glicogen şi de amplitudine mai mică. În timp ce ADN variază

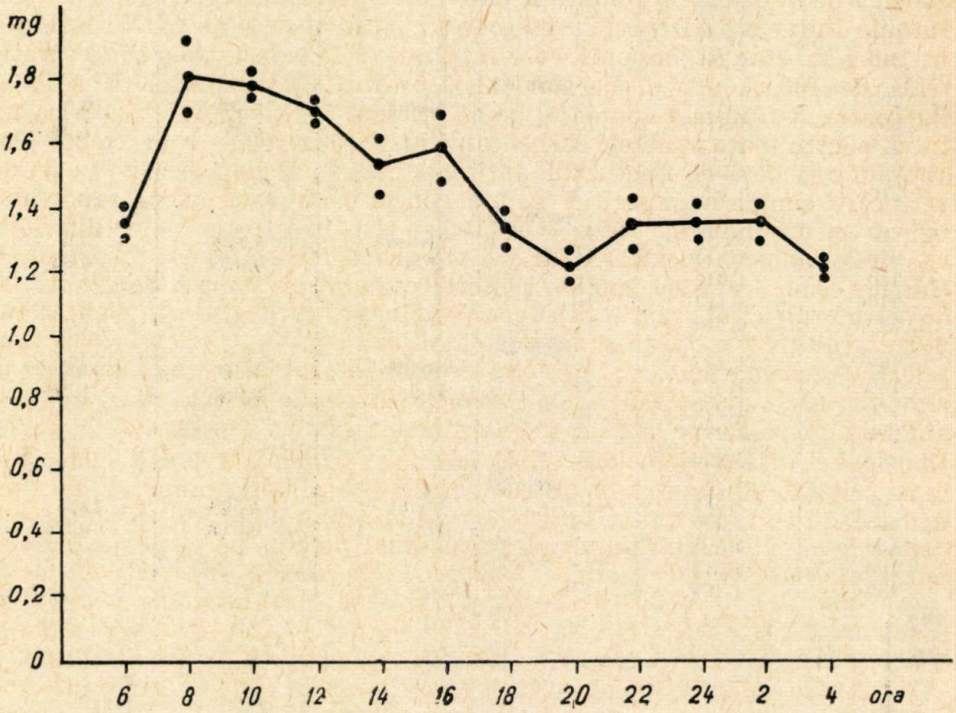


Fig. 2. — Curba ADN hepatic în 24 de ore (în 100 mg ţesut uscat şi degresat).

de la 1,2 la 1,8%, glicogenul variază concomitent de la 15,2 la 3%. În afară de diferenţele de amplitudine, între curbe există mici decalaje, care se datoresc, probabil, dispersiei orare.

DISCUŢII

Presupunînd că variaţia acizilor dezoxiribonucleici din 24 de ore ar fi statistic asigurată, se poate pune întrebarea dacă această variaţie se datoreşte unei fracţiuni metabolice a ADN sau este o consecinţă a prezenţei balastului reprezentat de glicogen, eventual şi de alte substanţe. În privinţa celorlalte substanţe variabile ale hepatocitului angajate în activitatea de elaborare a glucuronoconjugatelor şi a altor produşi metabolici, trebuie să semnalăm că şi aceştia fluctuează în sens opus cu glicogenul şi, prin urmare, consensual cu ADN. Ele n-ar putea explica, prin urmare, o falsă periodicitate diurnă a ADN. Pe de altă parte, cantitatea lor în

țesutul hepatic este neînsemnată în raport cu cantitatea de glicogen. Rămîne să discutăm importanța balastului reprezentat de glicogen pentru concentrația de ADN în țesutul hepatic.

Metodologia cercetării trebuie să aibă în vedere dispersia rezultatelor. Schema de verificare a rolului pe care îl are „balastul" glicogenic în fluctuațiile diurne ale ADN este următoarea : o cantitate x de ADN conținută în 100 g substanță „impură" cu o cantitate y de balast are o concentrație reală de $100x/100 - y$. Dacă ar exista o cantitate constantă de ADN și fluctuația ar fi numai aparentă, adică pricinuită doar de fluctuația balastului, pentru toate punctele curbei cantitatea $100x/100 - y$ ar trebui — cu aproximația dată de fluctuațiile întîmplătoare — să fie aceeași. O cale de verificare simplă a supoziției făcute constă în transformarea raportului într-o ecuație liniară : $100x_i = k\ (100 - y_i)$, în care x_i sînt diferitele valori ale concentrației ADN, iar y_i sînt valorile respective ale glicogenului. Metoda celor mai mici pătrate permite calculul presupusei constante, al dispersiei sale și al validității supoziției făcute prin testul „t" aplicat raportului dintre constantă și devierea sa standard : k/s_k. O complicație deosebită în schema de calcul propusă o aduce faptul că variabilele $\bar{x}_i$ și $\bar{y}_i$ sînt ele însele aleatorii ($\bar{x}_i$ și $\bar{y}_i$ reprezintă mediile fiecărui lot), avînd o anumită dispersie pe care am determinat-o pentru fiecare lot în parte. Menționăm însă că perechile x_i, y_i, în număr de 60, sînt precis cunoscute în ce privește alăturarea lor, întrucît aparțin aceluiași animal, și că, prin urmare, dificultatea amintită se poate ocoli, scriind pentru absolut toate perechile x_i, y_i ecuația amintită și calculînd pe k și pe s_k pe acest material prin metoda celor mai mici pătrate. Procedînd în acest fel, obținem :

$100/k = k' = (100\ Sx_i - Sx_iy_i)/Sx_i^2$ (S fiind semnul sumei). În cazul nostru, $Sx_i = 89{,}776$, $Sx_i\,y_i = 783{,}83$, $Sx_i^2 = 138{,}18$ și, prin urmare, $k' = (8977{,}6 - 783{,}83)/138{,}18 = 59{,}298$, de unde $k = 100/k' = 1{,}6864$.

Pentru calculul variantei lui k' vom proceda în felul clasic : $V_{k'} = L/2r^2$ unde $L = (Sx_i\,y_i - Sx_i)/Sx_i^2 = 5{,}025$, iar $1/2r^2 = Su^2/(n - p)$, unde n este numărul ecuațiilor (adică 60 în cazul nostru), iar p este numărul necunoscutelor (adică una în cazul nostru), de unde urmează că numitorul este 59. La rîndul ei,

$$Su^2 = k'Sx_i\,(y_i - 100) + S\,(y_i - 100)^2 = 9023{,}82.$$

$1/2r^2 = 9023{,}82/59 = 152{,}94$ (r fiind așa-numita precizie). Conform definiției arătate mai sus, $V_{k'} = 5{,}023.152{,}94 = 768{,}22$, iar $s_{k'} = V_{k'}^{1/2} = 27{,}72$, și de aici $t_{59} = 59{,}289/27{,}72 = 2{,}139$ cu $0{,}05 > P > 0{,}02$, ceea ce arată că există o suficientă potrivire între ipoteza făcută (variațiile diurne ale ADN se datoresc variației contrare a balastului) și realitate, mai ales avînd în vedere dispersia importantă a glicogenului, de mult cunoscută și în literatură. Prin urmare, balastul de glicogen, alături de apă și grăsime, poate explica variația acidului dezoxiribonucleic din 24 de ore, raportată la țesutul umed. Aceasta este o dovadă împotriva admiterii existenței de ADN cu funcții exclusiv metabolice, precum și împotriva unui ciclu diurn real al acestui compus, cel puțin în ficat.

Cu aceste constatări ajungem la concluzia că dozările de ADN din ficat trebuie corectate cu privire la apă, grăsime și glicogen. Dacă în majoritatea lucrărilor corecția pentru apă și grăsime se face de cîte ori este

vorba să apreciem variaţii de ADN, corecţia pentru glicogen nu a intrat în rutină, ceea ce face ca cifrele date în literatură să fie inutilizabile pentru comparaţii.

Nu putem încheia şirul consideraţiilor noastre fără a atrage atenţia asupra necesităţii de a calcula adevărata valoare a ADN din ficat cu metoda celor mai mici pătrate, demonstrată mai sus. Potrivit rezultatului bazat pe 60 de dozări, această valoare pentru şobolanul Wistar este de 1,6864%, rotund 1,7% pentru ţesutul liberat de balast.

CONCLUZII

Nu există un ciclu diurn al ADN în ficatul de şobolan Wistar.

Fluctuaţii de ADN pot fi simulate de „balastul" tisular.

Alături de apă şi grăsime, în compunerea balastului tisular al ficatului intră şi glicogenul.

Cantitatea corectată de ADN raportată la ţesut liberat de balast este pentru ficatul şobolanului Wistar de 1,6864, sau aproximativ 1,7%.

Prezentată la redacţie
la 26 iunie 1964

Catedra de anatomie II a Institutului Medico-Farmaceutic, Bucureşti

BIBLIOGRAFIE

J. M. WEBB, H. LEVY. *A sensitive method for the determination of DNA in tissues.* J. biol. Chem., **213**, 107–117 (1955).

DOLJANSKI, *The growth of the liver with special reference to mammals*, Internat. Rev. Cytol., **10**, 217–241 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 337—345 (1964)

TEHNICA DE ELUȚIE ȘI DETERMINARE ÎN FLUX CONTINUU A ARN FRACȚIONAT PE COLOANĂ DE DEAE-CELULOZĂ*

RADU PORTOCALĂ și LIVIU POPA

616.318

Rezumat.— Se descriu rezultatele obținute prin separarea pe o coloană de DEAE-celuloză a doi acizi ribonucleici tisulari diferiți, cu ajutorul unei tehnici originale de eluție și determinare continuă.

Cuva de cuarț a spectrofotometrului Zeiss VSU_1 a fost adaptată pentru citiri continue, ceea ce permite controlul permanent al eluției.

Curbele de eluție ale acizilor ribonucleici cromatografiați, obținute prin citirea la 260 mμ, sînt specifice pentru fiecare în parte. În timp ce acidul ribonucleic extras cu fenol din creierul de șoarece normal prezintă trei componente principale, acidul ribonucleic comercial prezintă patru componente, situate la alți gradienți de NaCl.

Întrebuințarea tehnicii cromatografiei pe coloană la studiul moleculelor de acizi nucleici a condus la obținerea unor informații prețioase asupra proprietăților fizice, chimice și biologice ale acestor compuși.

După Mandell și Hershey [1] și Hershey și Burgi [2], metoda cromatografiei pe coloană este extrem de sensibilă pentru fracționarea moleculelor de ADN, datorită mărimilor moleculare diferite.

Folosind o metodă asemănătoare, Sueoka și Cheng [3] reușesc să separe acidul ribonucleic (ARN) ribozomal de ARN-solubil. Mai mult decît atît, acești autori arată posibilitatea separării ARN ribozomal de 16 *S* de cel de 23 *S*.

Se pare că proprietățile cromatografice ale acizilor nucleici (AN) sînt determinate de trei efecte principale : în primul rînd de dimensiunile lor (efectul de mărime), în al doilea rînd de conținutul lor în baze azotate (efectul G—C) și în al treilea rînd de numărul legăturilor de hidrogen (efectul H).

Prezentăm mai jos primele rezultate obținute prin separarea pe coloană de dietilaminoetil-celuloză (DEAE) a doi ARN tisulari, ale căror caracteristici au fost determinate printr-o tehnică nouă de înregistrare în lumină ultravioletă, la 260 mμ.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba engleză.

MATERIALE ŞI METODE

Extracţia şi dozarea ARN. Acizii ribonucleici întrebuinţaţi în aceste fracţionări au fost ARN comercial (Chinoin-Budapesta) şi ARN proaspăt, extras cu fenol din creierul de şoarece normal, printr-o tehnică descrisă anterior [1]. Concentraţia ARN extras cu fenol a fost determinată spectrofotometric şi colorimetric şi este în medie de 200 μg pe ml. Determinările paralele ale concentraţiei ARN prin metoda spectrofotometrică şi colorimetrică arată cantităţi foarte apropiate. În general, metoda spectrofotometrică dă valori cu aproximativ 5—10 μg/ml mai mari decît metoda colorimetrică, datorită unor cauze discutate într-o altă lucrare [2]. Adsorbentul pentru cromatografia pe coloană a fost dietilaminoetil-celuloza (DEAE).

Activarea şi reactivarea DEAE-celulozei. Într-un flacon Erlenmeyer de 250 ml se introduc aproximativ 5 g de DEAE-celuloză. Se adaugă în porţiuni mici 150 ml de NaOH 0,5 N, agitînd continuu cu un agitator magnetic, timp de 15—20 de minute. Celuloza astfel tratată se spală abundent cu apă bidistilată, pe o pîlnie Büchner, pînă la neutralitatea apei de spălare. Se repetă operaţia de tratare a celulozei cu 100 ml de NaOH 0,25 N, agitînd amestecul timp de 10 minute.

DEAE-celuloza, spălată din nou cu apă bidistilată pînă la neutralitate, se tratează în două reprize de cîte 5 minute fiecare, agitînd continuu, cu cîte 50 ml de alcool etilic de 96°. Se îndepărtează alcoolul prin filtrare, iar celuloza rămasă pe filtru se spală cu apă bidistilată şi după aceasta se introduce într-un flacon Erlenmeyer în care se găsesc aproximativ 100 ml de tampon fosfat de sodiu 0,05 M, la pH 6,7. Suspensia se agită timp de 15 minute şi se filtrează, iar celuloza este din nou tratată cu 100 ml de tampon, timp de 10 minute.

DEAE-celuloza astfel pregătită este folosită pentru încărcarea coloanelor cromatografice.

Eluţia. Eluţia progresivă sau în gradient crescător, cu ajutorul unei soluţii de NaCl, s-a realizat prin sistemul reprezentat în figura 1. În pîlnia de decantare (*P*) se introduc 100 ml NaCl 2 M în tampon fosfat de sodiu 0,05 M la pH 6,7, iar în balonul de amestecare (*A*) 100 ml tampon fosfat 0,05 M la pH 6,7. Prin trecerea continuă a soluţiei de NaCl din pîlnia *P* în balonul *A*, în care ambele soluţii sînt amestecate cu un agitator magnetic (*EM*), se realizează creşterea gradată a concentraţiei de NaCl.

Totodată, pe măsură ce soluţia concentrată de NaCl din pîlnia *P* pătrunde în balonul *A*, din acesta iese prin tubul lateral, spre coloana *C*, un volum echivalent de soluţie de NaCl cu o concentraţie din ce în ce mai ridicată (fig. 2).

Pentru o mai bună fracţionare a ARN, am realizat şi eluţii în care creşterea gradientelor de NaCl s-a făcut mult mai lent. În acest scop, în pîlnia *P* am introdus o soluţie de NaCl de 1,2 M în locul soluţiei de NaCl 2 M.

Întrucît am observat variaţii ale gradientului de NaCl de la o experienţă la alta, am verificat pentru fiecare probă eluată şi valorile gradientului. De la început trebuie să arătăm că determinările concentraţiilor saline ale gradientului nu urmează o creştere perfect liniară, ci îmbracă aspectul unei curbe convexe (fig. 3 şi 4).

Am determinat creşterea concentraţiei eluatului prin mai multe metode: volumetric, refractometric sau prin calcul. Fiecare metodă are avantajele şi dezavantajele ei. Determinarea volumetrică este foarte exactă, dar puţin expeditivă. Metoda refractometrică este foarte expeditivă, dar întrebuinţarea ei este limitată de posibilităţile de interferare a substanţei eluate, care poate modifica indicele de refracţie. În ceea ce priveşte folosirea metodei de determinare a concentraţiei eluatului prin calcul, este de la sine înţeles că ea trebuie verificată experimental, din timp în timp.

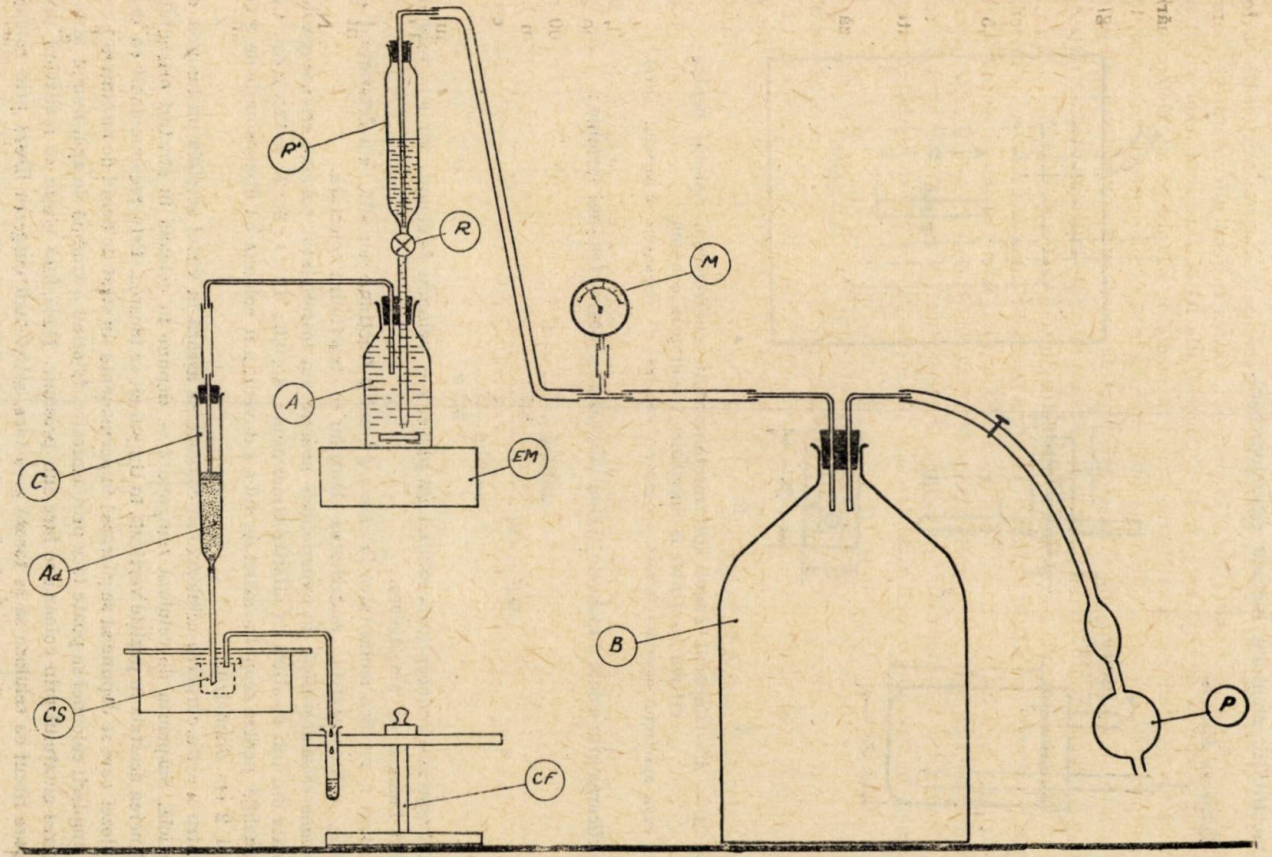


Fig. 1. — Schema generală a sistemului de cromatografie în flux continuu :

P — pară de cauciuc ; *B* — balon de 5 000 ml capacitate ; *M* — manometru, *P'* — pîlnia de decantare ; *R* — robinet ; *A* — balonul de amestecare ; *EM* — agitatorul magnetic ; *C* — coloana de cromatografiat ; *Ad* — adsorbentul (DEAE-celuloză) ; *CS* — cuva spectrofotometrului ; *CF* — colectorul de fracțiuni. Modul de funcționare este descris în text.

Datorită faptului că în cazul cercetat de noi indicele de refracţie al soluţiei de NaCl tamponate este foarte puţin modificat de indicele de refracţie al ARN eluat, am ales pentru determinarea molarităţii eluatului metoda refractometrică.

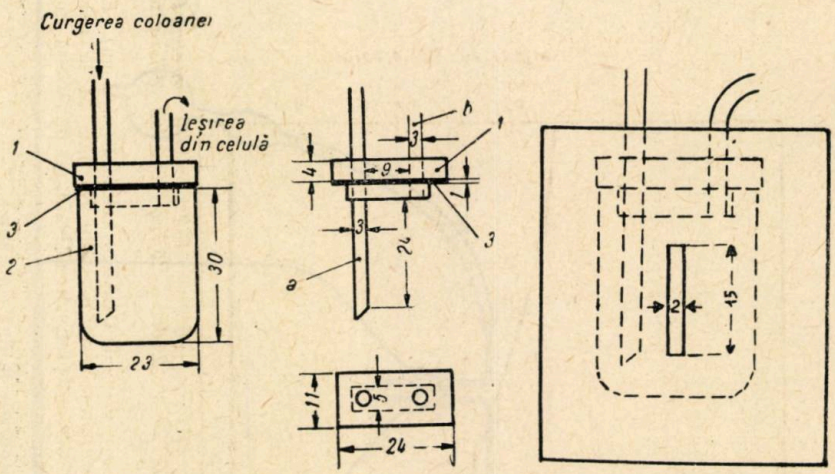


Fig. 2. — *A* — Capacul cuvei spectrofotometrului confecţionat special pentru citirea continuă a eluantului trecut prin coloană.
B — cuva spectrofotometrului închisă cu capacul adaptat; *C* — ecranarea suportului cuvei.

Verificarea prin calcul a molarităţii eluatului (*ME*) se obţine folosind formula :

$$ME = CR \frac{\text{antilog} \frac{x}{2{,}3\,v} - 1}{\text{antilog} \frac{x}{2{,}3\,v}}$$

în care, *CR* reprezintă concentraţia soluţiei din pîlnie, x = volumul de eluant, iar *v* = volumul soluţiei din balonul de amestecare.

Pentru a verifica molaritatea la care s-a eluat o fracţiune sau alta, s-a determinat de fiecare dată, refractometric, molaritatea eluatului în fracţiunea colectată.

Coloana cromatografică. În experienţele noastre am întrebuinţat coloane cromatografice confecţionate din tub de sticlă cu diferite dimensiuni : $8 \times 0{,}6$; 12×1 ; 8×2 ; şi 12×2 cm. Cea mai convenabilă pentru scopul urmărit de noi s-a dovedit a fi coloana cu dimensiunile de 8 cm înălţime şi 2 cm diametru.

Pentru a evita curgerea celulozei din coloană, se aşează în vîrful acesteia un tampon de vată de sticlă. Suspensia de celuloză tamponată se depune în coloană în straturi orizontale, prin menţinerea acesteia în poziţie verticală în timpul cît se încarcă. Este recomandabil ca deasupra celulozei care se depune să se găsească în permanenţă un strat de lichid de minimum 1 cm. Grăbirea umplerii coloanei se poate face prin aspiraţie, folosind o trompă de apă, numai atunci cînd curgerea eluatului prin coloană se face sub presiune. Dacă însă eluţia se realizează prin cădere, apare riscul ca celuloza să se taseze prea tare, astfel încît curgerea liberă prin coloană să fie foarte anevoioasă. Coloana de 8×2 cm, întrebuinţată în majoritatea cercetărilor noastre, a fost încărcată cu DEAE-celuloză pînă la înălţimea de 5 cm.

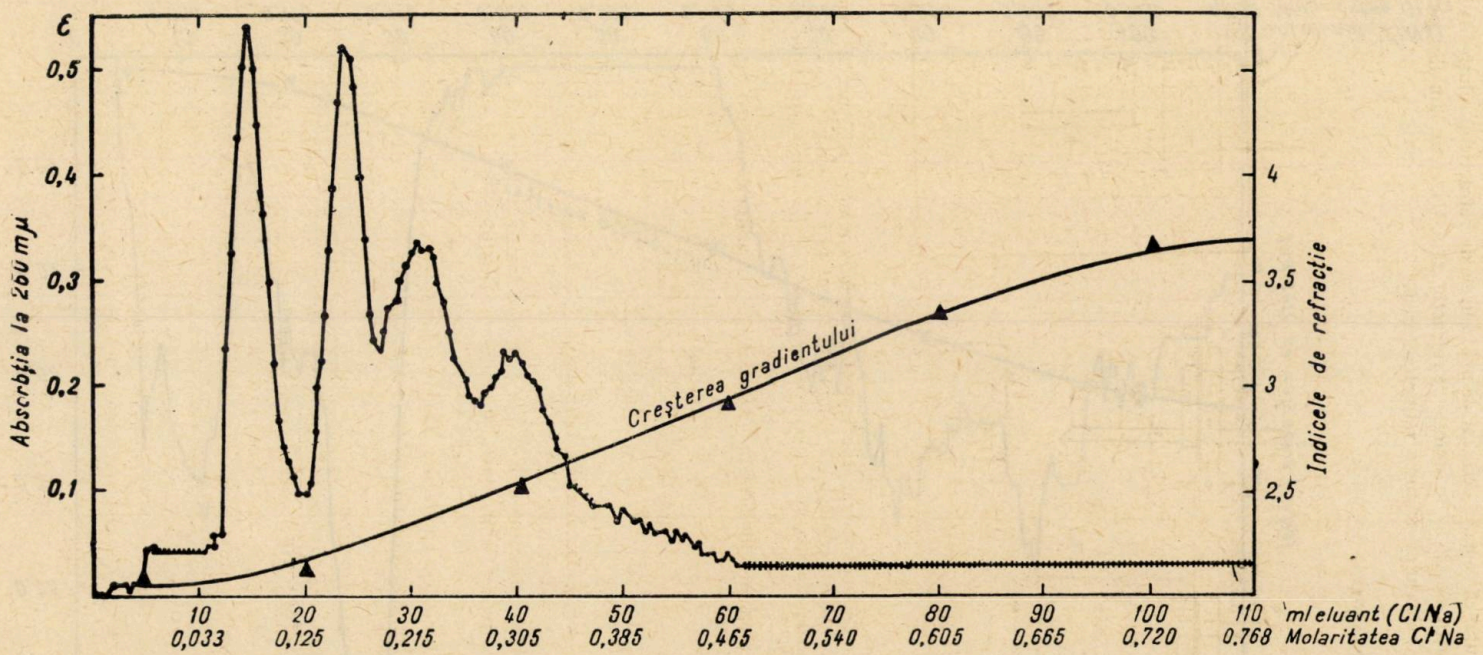


Fig. 3. — Curba de eluție a 1 000 μg de ARN comercial (Chinoin) cromatografiat pe o coloană de DEAE — celuloză (5×2 cm). Eluția s-a făcut în flux continuu cu ajutorul unui gradient de NaCl. Coloana a fost echilibrată cu tampon de fosfat de sodiu Na 0,05 M la pH 6,7. Pe una din ordonate sînt trecute valorile extincției citite la 260 mμ, pe a doua valorile indicelui de refracție al NaCl, iar pe abscisă molaritatea și numărul de ml de NaCl.

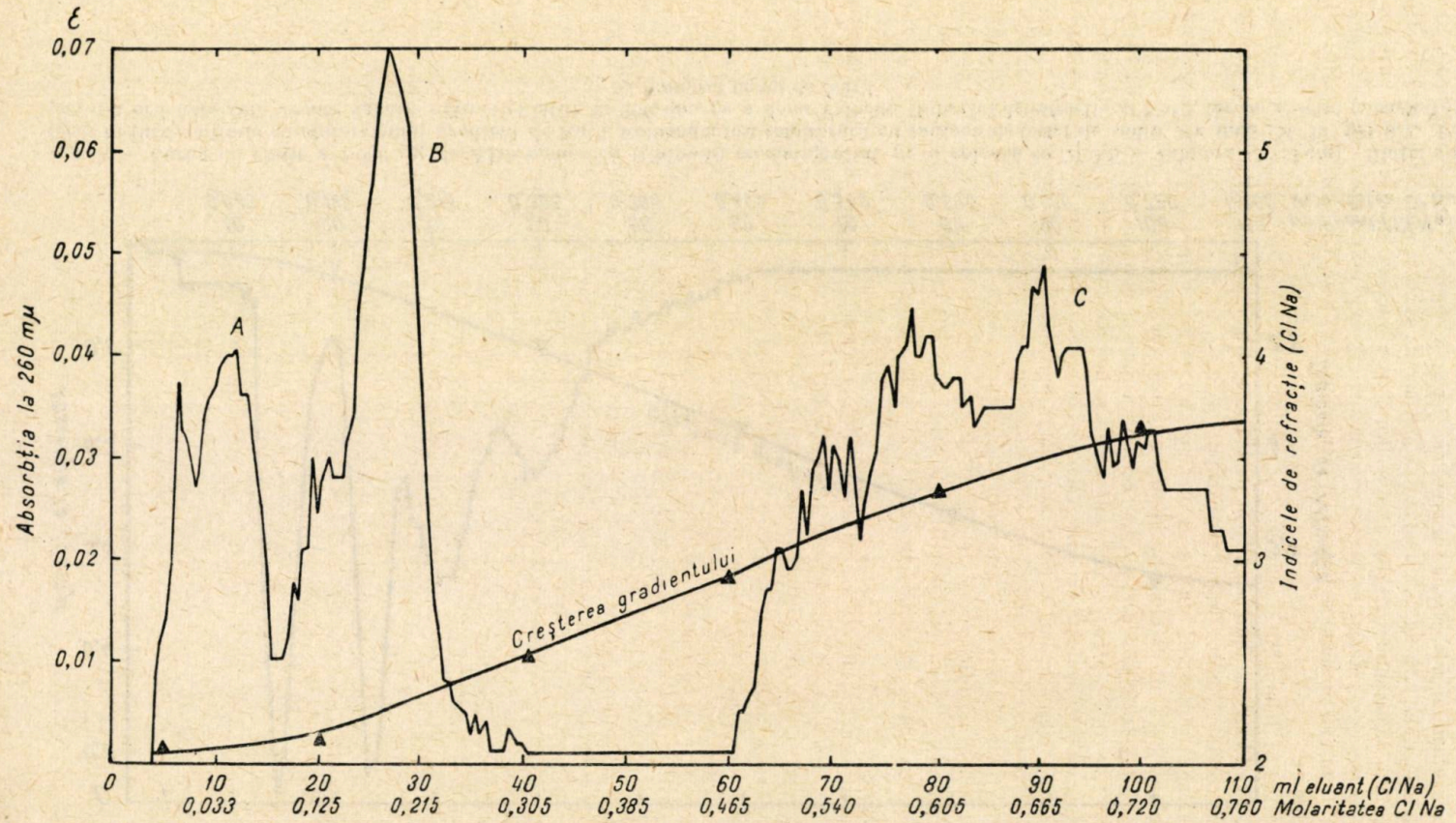


Fig. 4. — Curba de eluție a 864 μg de ARN extras cu fenol din creierul de șoarece normal. Condițiile de lucru au fost cele descrise în figura 3.

Trecerea eluatului prin coloană sub presiune. Pentru a asigura o curgere uniformă și totodată rapidă a eluatului prin coloană, am folosit o presiune de aer care varia între 2 și 12 cm Hg, aplicată în pîlnia de decantare (*P*) (fig. 1) și realizată cu o pară de cauciuc (*PC*). Între pară și pîlnia de decantare se intercalează un rezervor de aer (*B*) constituit dintr-un flacon cu capacitate mare. Controlul presiunii se face cu un manometru (*M*) gradat în cm Hg, așezat între rezervor și pîlnie.

Dat fiind că volumul de eluant ce trece prin coloană nu depășește 100 ml, un rezervor de aer de 5 000 de ml este practic suficient pentru a menține o curgere uniformă prin coloană sub presiune constantă, în tot timpul experienței.

Cu acest sistem, și în funcție de presiune, am obținut o viteză de curgere constantă, reglabilă între 0,3—3 ml de eluat pe minut, printr-o coloană de 5×2 cm.

Înainte de a trece ARN prin coloană, celuloza se spală cu aproximativ 20 ml de tampon fosfat de Na 0,05 M, la pH 6,7. Controlul spălării se face examinînd în spectrofotometru, la 260 mμ, extincția tamponului trecut prin coloană. Menționăm că în condițiile noastre experimentale eluantul folosit (soluția de NaCl tamponată) nu prezintă o curbă de extincție.

Adaptarea spectrofotometrului Zeiss-VSU—1 pentru citire continuă. În tehnicile curent utilizate, eluatul obținut din coloană este colectat într-un număr variabil de eprubete, în funcție de volumul fixat pentru fiecare fracție. Fiecare fracție este examinată ulterior în spectrofotometru, de obicei la 260 mμ în cazul acizilor nucleici. Considerînd că eluția se face cu 100 ml de eluant, iar în fiecare eprubetă s-au colectat 2 ml, în acest caz vom avea de examinat 50 de eprubete.

În aceste condiții, citirea efectivă la spectrofotometru a 50 de probe necesită un timp considerabil. În afară de acest impediment, însăși instabilitatea structurii moleculare a ARN, evidențiată spectrofotometric, datorită conservării în soluții cu forță ionică diferită, influențează structura sa moleculară și, implicit, valoarea extincției sale. În special din această ultimă cauză, citirea discontinuă are serioase dezavantaje.

Am căutat să eliminăm aceste neajunsuri prin adaptarea spectrofotometrului Zeiss-VSU—1 pentru citirea continuă a eluatului trecut prin coloana cromatografică.

În acest scop, cuva de cuarț de 0,5 cm grosime a fost prevăzută cu un capac 1 (reprezentat în fig. 2 *A*), confecționat din plexiglas, prin care trec două tuburi *a* și *b*. Acest capac, așezat pe cuva spectroscopului (fig. 2 *B*), o închide ermetic, datorită garniturii de cauciuc 3. Întreg dispozitivul este fixat în suportul special al spectrofotometrului, suport a cărui deschidere este ecranată ca în figura 2 *C*. Fanta tăiată în ecran este astfel calculată și centrată, încît se așează exact în drumul fasciculului luminos emis de monocromator. În acest mod, în drumul fasciculului dintre monocromator și celula fotoelectrică este așezată celula, ceea ce permite o citire continuă a soluției eluate.

Prin tubul *a*, legat direct de coloană, eluatul pătrunde pînă în fundul cuvei spectrofotometrice. Pe măsură ce eluatul se scurge din coloană, prin al doilea tub iese o cantitate echivalentă de lichid, care se colectează fie într-un colector de fracțiuni, fie în eprubete gradate.

În acest fel, eluatul trece continuu prin cuva spectrofotometrului și poate fi examinat din 0,2 în 0,2 ml, sau mai puțin. Eluția în gradient crescător de NaCl are avantajul de a ușura trecerea progresivă a eluatului prin fața fantei spectrofotometrului, de jos în sus. Pe măsură ce în cuvă intră gradienți din ce în ce mai concentrați de NaCl aceștia obligă eliminarea gradienților de NaCl mai diluați, pătrunși anterior în cuvă. Astfel este asigurată curgerea continuă a eluatului prin celulă.

Pentru aplicarea acestui sistem mai este necesară înlocuirea capacului care închide cuvele spectrofotometrului, cu un alt capac care să fie perforat în dreptul celor două tuburi adaptate la cuvă.

Citirea continuă. Celula modificată după cum am arătat mai sus este așezată cu ajutorul suportului ei în spectrofotometru. În capătul superior al tubului *a*, care trebuie să aibă dimen-

siuni cît mai reduse, se introduce vîrful coloanei cromatografice. Robinetul R fiind închis, se realizează cu para de cauciuc presiunea dorită.

Prisma monocromatorului este reglată pentru lungimea de undă de 260 mμ, ca şi lampa emiţătoare cu hidrogen, ambele rămînînd nemodificate în tot cursul experienţei. Cuva CS fiind plină cu lichidul tampon care a servit la spălarea coloanei, serveşte pentru reglarea sistemului de compensare al spectrofotometrului şi obţinerea punctului zero. În coloană se introduce cu o pipetă gradată un volum determinat de soluţie de acid ribonucleic. Cu ajutorul dopului de cauciuc prin care trece tubul cu soluţia de NaCl tamponată se astupă coloana. Se pune în mişcare agitatorul magnetic din flaconul *A* şi se deschide robinetul *R*. Datorită presiunii existente în vasul *B*, lichidul din pîlnia *P* pătrunde în vasul *A*, realizînd scurgerea în coloană a unui gradient crescător de NaCl. În acest moment, şi în funcţie de gradient, în cuva *CS* se pot pune în evidenţă diferitele fracţiuni de ARN eluate de pe coloana încărcată cu DEAE-celuloză.

Evoluţia valorilor diferitelor fracţiuni este evidenţiată prin obţinerea unor maxime de extincţie. Aceste maxime pot fi înregistrate prin compensarea dispozitivului spectrofotometric, astfel încît firul electrometrului să fie în permanenţă readus la punctul zero. Cifrele citite pe tamburul compensatorului, raportate la volumele de eluent trecut prin coloană şi, implicit, la variaţiile molarităţii sînt înregistrate grafic. Ele dau curbe caracteristice pentru ARN studiat.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Fracţionarea pe coloană a unui ARN comercial are posibilităţi de aplicare reduse; ea ne-a servit ca model experimental pentru a cunoaşte afinitatea DEAE-celulozei faţă de ARN, reproductibilitatea rezultatelor, influenţa diferiţilor parametri ai coloanei asupra fracţionării etc. Cercetările preliminare au arătat că ARN comercial se adsoarbe bine pe DEAE-celuloză, iar eluţia efectuată în condiţii experimentale identice dă rezultate întotdeauna reproductibile.

După cum rezultă din figura 3, ARN comercial (Chinoin) se fracţionează în patru componente. Prima, care reprezintă componenta principală, se elueaza între 0,033 M NaCl şi 0,125 M NaCl şi are maximul de extincţie cel mai ridicat. A doua componentă, corespunzătoare fracţiunii de ARN cu o afinitate mai crescută pentru DEAE-celuloză, se elueaza între 0,125 M NaCl şi 0,2 M NaCl. Valoarea extincţiei acestei fracţiuni este apropiată de aceea a primei componente. Următoarele două componente, cu afinităţi din ce în ce mai crescute pentru adsorbant, se eluează la gradienţi de NaCl cuprinşi între 0,2 şi 0,35 M.

Fracţionarea ARN tisular extras cu fenol. Coloana cromatografică încărcată cu DEAE-celuloză echilibrată la pH = 6,7 separă ARN extras cu fenol din creierul de şoarece normal în trei fracţiuni principale (fig. 4). În ordinea în care s-au eluat de pe coloană, le-am notat cu literele *A*, *B* şi *C*. De obicei, fracţiunea *A* se eluează pînă la gradientul de 0,1 M NaCl, fracţiunea *B* la gradienţi cuprinşi între 0,1 şi 0,3 M NaCl, iar ultima fracţiune, *C*, de la 0,46 pînă dincolo de 0,76 M NaCl. Existenţa celor trei fracţiuni a fost pusă în evidenţă în mod constant în toate experienţele efectuate în condiţii identice. De la o experienţă la alta s-au observat însă diferenţe în ceea ce priveşte valorile relative ale extincţiei şi valorile gradientului la care se eluează fracţiunile.

Aceste variații sînt datorite, după toate probabilitățile, însăși structurii moleculelor de ARN. Astfel, este evident că între ARN comercial și ARN proaspăt extras cu ajutorul fenolului se înregistrează diferențe marcate ale aspectului curbelor obținute. Este cunoscut faptul că fenolul extrage un ARN nativ în care populația de molecule este incomparabil mai puțin denaturată față de ARN comercial, extras cu metode ce nu-i păstrează integritatea moleculară.

Credem totuși că și în cazul extracției fenolice moleculele obținute pot fi, în anumite condiții, diferite de la o extracție la alta. În adevăr, condițiile de recoltare și de conservare a țesutului înainte de extracție pot fi cauze ale modificărilor observate. În general însă așa cum am arătat mai sus, metoda dă rezultate reproductibile, ceea ce ne face să afirmăm că ea reprezintă o îmbunătățire a metodelor cromatografice pe coloană cunoscute pînă acum. În sprijinul acestei afirmații vine și faptul că pe curbele noastre accidentele observate sînt mult mai numeroase decît cele ce ilustrează publicațiile altor autori. Aceste accidente ne fac să presupunem încă de pe acum că ARN tisular extras prin metoda fenolică este mult mai heterogen decît se presupune, el fiind compus dintr-un amestec de molecule cu dimensiuni, și deci cu greutăți moleculare foarte variate.

Prezentată la redacție
la 4 martie 1964

Institutul de inframicrobiologie al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. J. D. MANDELL, A. D. HERSHEY, Annal. Biochem., **1**, 66 (1960).
2. A. D. HERSHEY, E. BURGI, J. Mol. Biol., **2**, 143 (1960)
3. N. SUEOKA, T. Y. CHENG, J. Mol. Biol., **4**, 161 (1962)
4. R. PORTOCALĂ, I. SAMUEL, St. cerc. Inframicrob., **XIV**, *3*, 269 (1963).
5. R. PORTOCALĂ, L. POPA, I. SAMUEL, E. PRAHOVEANU, St. cerc. Inframicrobiol., 1964 (sub presă).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 347 – 350 (1964)

COMPORTAREA ELECTROFORETICĂ A PROTEINELOR SOLUBILE DIN GERMENII DIFERITELOR SOIURI DE PORUMB *

VICTORIA ALEXANDRESCU

581.19

Rezumat. — Proteinele solubile din germenii de porumb provenind de la două varietăţi diferite (*indentata* şi *indurata*) prezintă acelaşi număr de fracţiuni. Repartizarea proteinelor pe fracţiuni diferă de la soi la soi. Fracţiunea proteică cu mobilitatea cea mai mare este mai bine reprezentată la varietatea *indentata* (ICAR-54, Lester Phister) decît la varietatea *indurata* (Romînesc de Studina, Dobrogean). Hibridul Dobrogean × Lester Phister prezintă electroforegrame asemănătoare cu soiul polenizator Lester Phister.

Folosirea azotului ca îngrăşămînt măreşte conţinutul de proteină brută din bob prin creşterea proporţiei de zeină, iar creşterea numărului de plante la hectar determină reducerea conţinutului de proteină brută în bob, în sensul unei scăderi a proporţiei de zeină. Faptul că mărirea sau scăderea cantităţii de proteină brută are loc datorită creşterii sau scăderii proporţiei de zeină din bobul de porumb arată că proteinele cu rol biologic, globulinele şi glutelinele, nu ar fi influenţate de aceste variaţii sau că sînt influenţate într-o măsură mult mai mică [1].

Judecînd faptele numai după rezultatele obţinute în urma cercetării cantitative a proteinelor brute sau a altor componente (glucide, lipide etc.) din boabe, se poate afirma că deosebirile de structură datorite particularităţilor de soi nu au decît o importanţă secundară în determinarea deosebirilor de compoziţie chimică şi că porumburi cu înfăţişare diferită nu se deosebesc prea mult după compoziţia chimică medie.

Calitativ, în bobul de porumb ar trebui să existe diferenţieri în compoziţia lui chimică, ca, de exemplu, în ceea ce priveşte proteinele, acizii nucleici etc., diferenţieri care să corespundă particularităţilor varietăţii şi soiului.

În literatura consultată de noi nu am găsit indicaţii în acest sens.

Plecînd de la această idee, ne-am propus să vedem dacă cercetarea în paralel, în aceleaşi condiţii, a proteinelor solubile din germenii de porumb de la diferite soiuri prin metoda electroforezei pe hîrtie relevă anumite deosebiri.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba engleză.

Pentru aceasta am ales două varietăți de porumb : *dentiformis* (*indentata*) și *indurata*. Din fiecare varietate am lucrat cu două soiuri, și anume : ICAR-54 și Lester Phister din varietatea *indentata*, și Romînesc de Studina și Dobrogean din varietatea *indurata*. În plus, am lucrat și pe un hibrid obținut prin încrucișarea soiului Dobrogean, folosit ca formă maternă, cu soiul Lester Phister, folosit ca formă paternă.

Pentru separarea germenilor de endospermi, semințele de porumb s-au ținut în apă timp de 3—4 ore. Germenii s-au separat manual de endospermi și apoi s-au uscat la temperatura camerei. Extracția substanțelor proteice din embrioni s-a efectuat după metoda descrisă de Mertz și colab. [2], cu unele modificări descrise într-o lucrare anterioară, în care am cercetat comportarea electroforetică a proteinelor solubile din germenii și endospermii de porumb ICAR-54 [3]. În lucrarea de față, extractul proteic era liofilizat, iar proteina obținută sub formă de praf s-a păstrat în sticluțe închise, într-un exsicator cu clorură de calciu, la frigider, pe cînd în lucrarea anterioară extractul s-a concentrat în vid, pe clorură de calciu.

Electroforeza proteinelor s-a făcut în soluție tampon de acid succinic-hidroxid de sodiu, cu adaos de soluție de fosfat disodic pH final 8,2—8,6 [3]. Determinările s-au făcut pe hîrtie Whatman nr. 1, folosindu-se o cădere de potențial de 7 V/cm, timp de 9 ore, intensitatea curentului fiind de 0,5 mA/cm.

Punerea în evidență a fracțiunilor proteice s-a făcut cu o soluție de albastru de bromfenol. Determinarea cantitativă a procentului fracțiunilor proteice separate s-a făcut prin metoda eluției, cu citirea extincțiilor la fotocolorimetrul FEK.

În figură sînt redate în paralel cîte o electroforegramă pentru fiecare soi de porumb cercetat. Se constată prezența a patru fracțiuni pentru toate soiurile luate în cercetare ; uneori fracțiunea a doua se separă și ea în două subfracțiuni distincte. Valorile procentuale relative și mobilitățile acestor fracțiuni sînt redate în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Procentul relativ și mobilitatea fracțiunilor proteice solubile din germenul de porumb din diferite soiuri

Soiul	Fracțiunea			
	I	II	III	IV
ICAR-54	14	29,5	38,5	18
Lester Phister	21	29	30	20
Hibrid Dobrogean × Lester Phister	16	32	35	17
Dobrogean	19	36	30	15
Romînesc de Studina	14	28	44	14
Mobilitatea $\times 10^{-5}$ cm^2/s/V	0,61	1,47	2,07	—

Din examinarea electroforegramelor și a datelor din tabelă se constată că cantitatea de proteine din fiecare fracțiune variază de la soi la soi. Între soiurile care fac parte din aceeași varietate nu sînt modificări în ceea ce privește aspectul electroforegramelor ; între soiurile care provin

din varietăţi diferite se observă o deosebire, şi anume fracţiunea a patra la electroforegramele obţinute cu extractele de la soiurile ICAR-54 şi Lester Phister, din varietatea *dentiformis*, se găseşte pe o porţiune mai întinsă, conţinînd un procent relativ de proteine de 18—20%; pentru

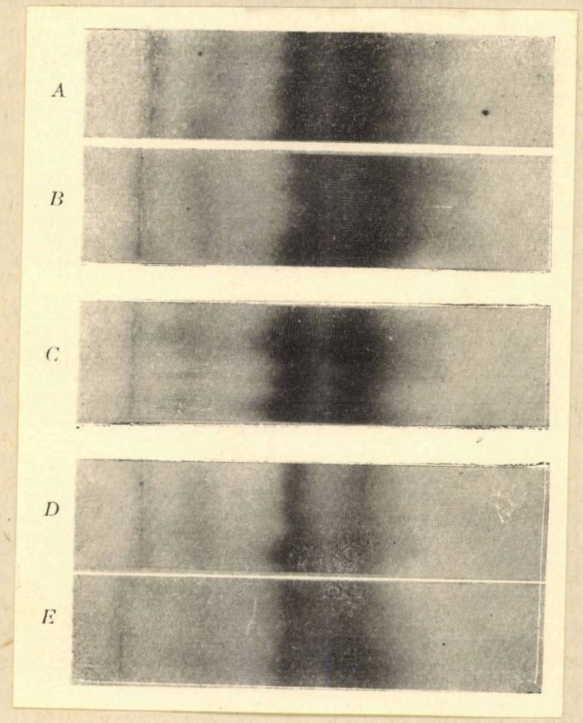


Fig. 1. Electroforegramele proteinelor solubile din germenii semințelor de porumb din diferite soiuri.

A — ICAR-54; *B* — Lester Phister; *C* — Hibridul Dobrogean × Lester Phister; *D* — Dobrogean; *E* — Romînesc de Studina.

soiurile Romînesc de Studina şi Dobrogean, din varietatea *indurata*, fracţiunea a patra este mai slab reprezentată atît pe electroforegramă, cît şi cantitativ (14—15%).

Această deosebire se poate datora fie faptului că soiurile ICAR-54 şi Lester Phister conţin o cantitate mai mare de proteine cu mobilitate mare, care de aceea sînt mai bine reprezentate pe electroforegramă decît la soiurile Romînesc de Studina şi Dobrogean, fie faptului că aceste două soiuri conţin şi alte proteine. Pentru a vedea care dintre aceste două ipoteze este valabilă, vor trebui folosite şi alte metode.

Proteinele solubile extrase din germenii hibridului cercetat prezintă tot patru fracţiuni proteice, electroforegramele avînd aspectul celor obţinute de la soiul Lester Phister. Deci, acest hibrid a moştenit din punctul de vedere al proteinelor caracterele soiului polenizator (Lester Phister).

De altfel, în cazul hibridului cercetat de noi, și forma boabelor de porumb este asemănătoare soiului Lester Phister.

Examinînd datele obținute cu soiul ICAR-54 în lucrarea precedentă [3] și acum, se constată că liofilizarea față de concentrarea în vid pe clorură de calciu aduce modificări mobilității proteinelor, deci sarcinii electrice a moleculei lor. Acest lucru s-a verificat lucrîndu-se în paralel prin ambele procedee, precum și folosind boabe de porumb din recoltele 1960 și 1962. Nu se observă diferențe între electroforegramele obținute cu extractele proteice din boabele de porumb după anul de recoltare, ci numai după felul de prelucrare a materialului experimental. Deosebirile se observă atît în ceea ce privește mobilitatea unor proteine, cît și repartizarea lor în fracțiuni. Deosebirile cele mai accentuate le prezintă fracțiunea întîi, de la start, care în cadrul liofilizării manifestă o mobilitate mult mai mică. Modificarea (denaturarea) proteinelor animale prin păstrarea sau prelucrarea lor la temperaturi de —15 °C este cunoscută în literatură [4—7], însă în ceea ce privește proteinele vegetale nu am găsit indicații similare în literatura cercetată.

În concluzie, putem arăta următoarele :

a) Proteinele solubile provenite de la diferite soiuri și varietăți de porumb (*Zea mays*) prezintă același număr de fracțiuni electroforetice.

b) Cantitatea de proteine din fiecare fracțiune electroforetică variază de la soi la soi.

c) Soiurile de porumb care fac parte din varietăți diferite (*indentata* și *indurata*) prezintă deosebiri în ceea ce privește aspectul electroforegramei, și anume la fracțiunea cu mobilitatea electrică cea mai mare.

d) La hibridul Dobrogean × Lester Phister cantitatea de proteine din fiecare fracțiune este intermediară între cantitățile corespunzătoare de la soiurile care i-au dat naștere, cu excepția fracțiunii a treia, iar aspectul electroforegramei este asemănător cu al electroforegramei soiului polenizator Lester Phister.

e) Modul de prelucrare a extractului proteic se repercutează asupra sarcinii electrice a moleculelor de proteine și deci asupra repartizării lor în fracțiuni sub acțiunea curentului electric.

Primită la redacție
la 20 iunie 1964

*Institutul de biochimie al
Academiei R.P.R., București*

BIBLIOGRAFIE

1. H. SLUȘANSCHI, *Compoziția chimică și întrebuințarea porumbului*, în studiul monografic *Porumbul*, Edit. Acad. R.P.R., București (1957), 138.
2. E. T. MERTZ, N. E. LLOYD, R. BRESSANI, *Studies on corn proteins. II. Electrophoretic analysis of germ and endosperm extracts*, Cereal Chem., **35**, *2*, 146 (1958).
3. V. ALEXANDRESCU, *Localizarea activității amilazei și invertazei pe fracțiunile proteice solubile din semințele de porumb*, St. cerc. biochim., **5**, *1*, 7 (1962).
4. H. A. ZONDAG, *Lactate dehydrogenase isozymes : lability at low temperature*, Science, **142**, 965 (1963).
5. G. CURZON, L. VALLET, *The purification of human ceruloplasmin*, Biochem. J., **74**, 279 (1960).
6. L. A. UTEVSKA, *Vlianie nizkih temperatur na nativnoe sostoianie globuliarnih belkov*, Ukr. bioh. J., **31**, 12 (1959).
7. F. HAUROWITZ, *Chemistry and biology of proteins*, Acad. Press, New York (1950).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 351–357 (1964)

RELAȚIE ÎNTRE CONȚINUTUL ÎN PEROXIZI LIPIDICI ȘI ACTIVITATEA CATALAZICĂ A DIFERITELOR ȚESUTURI (NORMALE, TUMORALE, IRADIATE) *

MARIA FURNICĂ

616.155.3-09

Rezumat. — S-a constatat în țesuturi normale de șobolan (ficat, rinichi, splină), precum și în diverse tipuri de tumori de șobolan (Yoshida, Guérin, Walker, leucosarcom, Jensen), de șoarece (sarcom 180 și sarcom 37), de hamster (tumoarea H 10) și tumori umane (sîn, rect) o relație de proporționalitate inversă între conținutul natural în peroxizi lipidici și activitatea catalazică. Țesuturile cu activitate catalazică intensă au un conținut scăzut în peroxizi lipidici, și invers, cele cu activitate catalazică slabă conțin mulți peroxizi. În țesuturile iradiate se constată o scădere bruscă a activității catalazice după 2 zile de la iradiere. Revenirea spre normal a activității catalazice în zilele următoare se face paralel cu creșterea peroxizilor, fapt care dovedește perturbarea relației catalază-peroxizi în țesuturile iradiate.

Studiul peroxizilor lipidici constituie o problemă deosebit de importantă a biochimiei radiațiilor, deoarece una dintre ipotezele privind mecanismul de acțiune al radiațiilor se referă tocmai la formarea acestor compuși [1], [2].

Peroxizii lipidici rezultă din oxidarea acizilor grași nesaturați, prezenți în țesuturi sub formă liberă sau înglobați în fosfolipide. În mod normal, țesuturile conțin cantități foarte mici din acești compuși, formarea lor fiind frînată de prezența vitaminei E, care exercită un puternic rol antioxidant [3]. Sub acțiunea radiațiilor ionizante apar radicali radiolitici cu caracter oxidant, care inițiază oxidarea diferiților compuși biologici și induc o serie de reacții în lanț, avînd ca efect o intensă peroxidare a lipidelor nesaturate.

În lucrări anterioare, am pus în evidență faptul că formarea peroxizilor lipidici sub acțiunea radiațiilor are loc cu viteze diferite, care depind de natura țesutului respectiv [4–6]. Am căutat să găsim o explicație acestui fapt, cercetînd conținutul peroxidic al diferitelor țesuturi, în paralel cu determinarea activității catalazei. Ipoteza noastră a fost că țesuturile cu activitate catalazică intensă se peroxidează mai greu, enzima

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba franceză.

descompunînd o mare parte din H_2O_2 formată sub acțiunea radiațiilor. Pentru verificarea acestei ipoteze, am determinat conținutul în peroxizi lipidici și activitatea catalazică în diverse tipuri de tumori animale sau umane, precum și în țesuturi normale și iradiate.

MATERIAL ȘI METODĂ

I. S-au efectuat determinări de peroxizi lipidici și activitate catalazică în următoarele tipuri de țesuturi :

1) Diferite tumori experimentale de șobolan : sarcom Yoshida, carcinom Guérin, carcinosarcom Walker, leucosarcom, sarcom Jensen.

2) Tumori de șoarece : sarcomul 180 și sarcomul 37.

3) Tumoarea H 10 de hamster.

4) Unele tumori umane (sîn, rect).

5) Țesuturi normale de șobolan : creier, ficat, rinichi, splină.

6) Țesuturi de șobolani iradiați (ficat, splină) recoltate după 1,2,3,4,5 și 7 zile de la iradierea cu 1 000 r.

II. În altă serie de experiențe s-a administrat șobolanilor, înainte de iradiere, i. p. cîte 50 γ catalază în soluție apoasă, iar după 3 și 5 zile de la iradiere animalele au fost sacrificate, dozîndu-se peroxizii lipidici în ficat.

Experiențe analoge au fost efectuate și *in vitro* : omogenat 20% de ficat de șobolan a fost iradiat *in vitro* cu doza de 4 000 r, în absența sau în prezența unei soluții de catalază (100 γ catalază pentru 400 mg țesut). După iradiere, țesuturile au fost incubate 60 min la 37°, pentru a favoriza peroxidarea inițiată în timpul iradierii. După acest interval, în probele incubate s-au dozat peroxizii lipidici.

Determinarea conținutului în peroxizi lipidici s-a efectuat prin metoda cu acid 2-tiobarbituric [7]. Rezultatele au fost exprimate în extincția E produsă de 200 mg țesut umed la $\lambda = 530$ mμ.

Activitatea catalazei s-a determinat plecînd de la metoda manometrică [8], printr-o tehnică modificată de noi, la aparatul Warburg, în tampon fosfat de pH = 6,8, la 23°C. Citirile s-au efectuat la fiecare 2 min, urmărindu-se degajarea de oxigen timp de 10 min. Rezultatele au fost exprimate în $mm^3 O_2$ degajați în 10 min de 1 mg țesut proaspăt. Fiecare cifră din tabele reprezintă media a 8 experiențe.

REZULTATE

1. În tumorile de șobolan (tabela nr. 1) se constată un conținut foarte scăzut de peroxizi lipidici (tumorile Yoshida, Guérin, Walker și leucosarcom). O excepție o constituie tumoarea Jensen, în care se găsește o cantitate de peroxizi lipidici mult crescută. Activitatea catalazică a acestor tumori este invers proporțională cu conținutul lor peroxidic : tumorile Yoshida și Guérin au activitatea catalazică cea mai crescută, tumorile Jensen prezintă activitatea catalazică cea mai redusă.

Această relație se observă și la sarcomul 180 și sarcomul 37 de șoarece : conținutul mai crescut în peroxizi lipidici al acestor tumori este însoțit de o activitate catalazică foarte redusă.

Același lucru se observă în tumoarea H 10 de hamster : cantitatea de peroxizi este scăzută, iar activitatea catalazică crescută.

Desigur că, studiind aceste tumori animale, nu putem vorbi de o activitate catalazică scăzută sau crescută decît numai comparîndu-le între ele, deoarece, în general, se știe că activitatea catalazei din tumori este mult redusă față de țesutul normal de origine.

Tabela nr. 1

Conținutul în peroxizi lipidici și activitatea catalazei în diferite tumori animale

Tumoarea	Peroxizi E_{530} mμ/200 mg țesut	Activitatea catalazică $mm^3 O_2$/10 min/1 mg țesut
șobolan		
sarcom Yoshida	0,043 (0,025—0,060)	107 (90—120)
carcinom Guérin	0,055 (0,034—0,082)	158 (113—206)
carcinosarcom Walker	0,062 (0,037—0,101)	99 (74—140)
leucosarcom	0,067 (0,026—0,154)	65 (47—77)
sarcom Jensen	0,300 (0,164—0,490)	45 (27—67)
șoarece		
sarcom 180	0,108 (0,080—0,120)	29 (20—40)
sarcom 37	0,130 (0,115—0,150)	36 (28—40)
hamster		
tumoarea H 10	0,042 (0,030—0,051)	149 (135—163)

2. În cîteva tumori umane studiate (tabela nr. 2) se constată un conținut în peroxizi lipidici foarte redus, de același ordin de mărime cu cel din tumorile animale, iar activitatea catalazei în tumorile umane este mai crescută decît în tumorile animale. Comparînd între ele aceste tumori umane, se observă că o creștere a conținutului peroxidic este însoțită de reducerea activității catalazei. În clasa tumorilor umane cercetările noastre vor fi continuate, pentru a urmări dacă în alte tipuri de tumori conținutul natural în peroxizi nu apare mai crescut.

Tabela nr. 2

Conținutul în peroxizi lipidici și activitatea catalazică a unor tumori umane

Nr.	Tipul de tumoare	Peroxizi E_{530} mμ/200 mg țesut	Activitate catalazică mm^3O_2/10 min/1 mg țesut
13 B.D.	tumoare sîn	0,029	380
14 C.V.	tumoare sîn	0,078	126
12 T.M.	tumoare rect	0,032	375
15 M.M.	tumoare rect	0,060	212
22 B.C.	tumoare rect	0,058	400
16 C.E.	chist ovarian	0,043	177

3. În țesuturi normale (tabela nr. 3) se știe că există o cantitate mică de peroxizi. Astfel, se observă un conținut redus în creier și ficat, mai crescut în rinichi și evident crescut în splină. În ceea ce privește acti-

vitatea catalazică a acestor țesuturi, ficatul prezintă activitatea cea mai intensă, urmînd după el rinichiul. Splina are o activitate de 6 ori mai scăzută decît ficatul.

4. Aceste rezultate ne-au dus la studierea acțiunii radiațiilor asupra catalazei și peroxizilor din ficat și splină. Am constatat că în urma iradierii se produce o creștere a peroxizilor lipidici, cu viteze diferite în splină și ficat. Splina este organul în care acumularea peroxizilor lipidici prezintă o creștere timpurie : după 24 de ore aceștia cresc cu 48% față de normal și continuă să crească pînă în ziua a 4-a de la începutul experienței, cînd ating valori maxime (115% creștere față de normal) (tabela nr. 4).

În ficat (tabela nr. 5), acumularea peroxizilor lipidici începe după 3 zile de la iradiere, atinge valori maxime în ziua a 7-a (217% creștere față de normal), după care începe procesul de descompunere a peroxizilor formați.

Tabela nr. 3

Conținutul în peroxizi lipidici și activitatea catalazică a țesuturilor normale de șobolan

Țesutul	Peroxizi E_{530} mμ/200 mg țesut	Activitate catalazică mm^3O_2/10 min/1 mg țesut
creier	0,023 (0,018—0,024)	22 (16—34)
ficat	0,043 (0,041—0,045)	3580 (3360—3915)
rinichi	0,095 (0,076—0,110)	2150 (1820—2540)
splină	0,116 (0,099—0,138)	460 (410—479)

Tabela nr. 4

Conținutul în peroxizi lipidici și activitatea catalazică din splina șobolanilor iradiați

Timpul de la iradiere	Peroxizi E_{530} mμ/200 mg țesut	Activitate catalazică mm^3O_2/10 min/1 mg țesut
normal	0,116 (0,099—0,138)	560 (380—780)
1 zi	0,172 (0,160—0,184)	550 (380—610)
2 zile	0,190 (0,170—0,205)	210 (160—280)
3 „	0,239 (0,220—0,260)	460 (260—700)
4 „	0,250 (0,219—0,280)	—
5 „	0,216 (0,200—0,240)	430 (270—780)
7 „	0,180 (0,160—0,185)	521 (230—800)

Tabela nr. 5

Conținutul în peroxizi lipidici și activitatea catalazică din ficatul șobolanilor iradiați

Timpul de la iradiere	Peroxizi E_{530} mμ/200 mg țesut	Activitate catalazică mm^3O_2/10 min/1 mg țesut
normal	0,043 (0,041—0,045)	2940 (2200—3880)
1 zi	0,045 (0,041—0,050)	3460 (2680—4260)
2 zile	0,048 (0,040—0,049)	820 (440—1000)
3 „	0,075 (0,070—0,085)	1720 (900—2460)
5 „	0,092 (0,087—0,100)	1700 (1200—2160)
7 „	0,137 (0,125—0,145)	2720 (1600—3800)

În ceea ce privește activitatea catalazei (tabelele nr. 4 și 5), se constată în ficatul animalelor iradiate o creștere a activității catalazei la 24 de ore de la iradiere. Începînd din ziua a 2-a, activitatea catalazei scade brusc în ficat și splină, fapt care coincide și cu o stare foarte proastă a animalelor. După acest interval, activitatea catalazei, deși redusă, prezintă tendințe de revenire spre normal.

Tabela nr. 6

Variațiile peroxizilor lipidici din ficatul șobolanilor iradiați după administrare de catalază

Timpul de la iradiere	Peroxizi (E_{530} mμ/200 mg țesut)		
	normali	iradiați	iradiați + catalază
3 zile	0,043 (0,041 – 0,045)	0,083 (0,068 – 0,094)	0,070 (0,064 – 0,076)
5 „		0,094 (0,080 – 0,110)	0,084 (0,068 – 0,100)

5. La șobolanii care au primit catalază înainte de iradiere (tabela nr. 6), peroxizii lipidici continuă să se formeze, dar cantitativ ei sînt ceva mai scăzuți decît în ficatul animalelor iradiate fără catalază (12% – 18%).

6. Iradierea *in vitro* a omogenatelor hepatice, în absența sau în prezența catalazei, nu a dus la rezultate concludente în privința vitezei de formare a peroxizilor.

DISCUȚII

Urmărind literatura existentă în privința acțiunii radiațiilor asupra formării peroxizilor, se observă că toți cercetătorii sînt de acord că acumularea peroxizilor se face treptat în zilele care urmează după iradiere și că viteza de dezvoltare a cantităților maxime depinde de natura țesutului respectiv [9]. În problema acțiunii radiațiilor asupra catalazei se constată unele rezultate discordante. Unii autori constată o inactivare treptată a catalazei hepatice sub acțiunea dozei de 800 r, cu inhibiția maximă după 7 zile [10]. Alți autori găsesc în ficatul șobolanilor, la 3 zile de la iradierea cu 1600 r, o inhibiție de 30% a catalazei, care se menține la acest nivel și după 12 zile [11]. Iradierea cu 1 000 r, 2 000 r și 3 000 r a crescut activitatea catalazei din mușchi după 1, 2 și 7 zile de la iradiere, în timp ce în sînge această activitate a crescut după 1 zi și a scăzut după 3 zile [12].

Se pare că la iradierea *in vivo* catalaza este foarte radiosensibilă, ea modificîndu-și mult activitatea, așa cum am arătat, din prima zi de la iradiere, chiar în organe radiorezistente (ficatul), în care alți compuși sînt mai puțin influențați (acizii nucleici, peroxizii, respirația tisulară).

În nucleele izolate din timus, scăderea activității catalazei se produce chiar după 1 oră de la iradierea cu 50, 200 și 1 000 r, fiind însoțită de reducerea cantității de ARN [13]. După cum au demonstrat cercetările lui Creasey [14], conținutul în catalază al nucleilor celulari diferă sensibil după natura țesutului, ajungîndu-se la concluzia că există o corelație

între radiosensibilitatea țesutului și conținutul catalazic al nucleului: în nuclee izolate din timus activitatea catalazei scade brusc la 50% după 200 r, în timp ce în ficat nici după 1 000 r scăderea nu depășește 20%.

Problema relației catalază-peroxizi a fost studiată în general, urmărindu-se acțiunea apei oxigenate asupra activității catalazei. Feinstein și colab. [10] nu au putut să inhibe catalaza după administrarea de H_2O_2, ajungînd la concluzia că inactivarea catalazei nu poate fi atribuită acestei substanțe.

Friedberg [15], folosind un inhibitor specific al catalazei, *3*-amino-*1*, *2*, *4*-triazolul, asociat cu iradierea, ajunge la concluzia că reducerea activității catalazei nu este răspunzătoare de moartea animalelor după iradiere.

Aceste fapte nu exclud interferența acțiunii catalazei cu alte procese. De exemplu, Kaplan și Paik [16] au demonstrat că în drojdie catalaza este asociată cu ARN, iar Aranson [17] sugerează că iradierea liberează catalaza din complexul cu ARN. Creșterea activității catalazice observată de noi după 24 de ore de la iradiere ar putea fi explicată prin liberarea catalazei din complexul cu acidul ribonucleic. Presupunem că, astfel liberată, catalaza este mai ușor inactivată de cantitățile mici de peroxizi formați sub acțiunea radiațiilor.

Desigur că procesul trebuie privit în interacțiune reciprocă, adică intensitatea activității catalazei poate juca rol în viteza de apariție a peroxizilor. S-ar putea explica în acest fel de ce în splina iradiată peroxizii cresc mai de timpuriu decît în ficat: în splina normală activitatea catalazică este de 6 ori mai redusă decît în ficat, astfel încît peroxizii formați în timpul iradierii pot induce reacțiile în lanț mult mai ușor decît în ficat de exemplu, unde intensa activitate catalazică descompune rapid H_2O_2 formată.

În cazul creierului se constată un conținut scăzut de peroxizi lipidici și o activitate catalazică foarte slabă. Explicația lipsei de peroxizi este faptul că în fosfolipidele creierului predomină acizii grași saturați, care nu pot fi peroxidați [18].

Relația catalază-peroxizi lipidici se verifică întotdeauna în cazul tumorilor studiate. Considerăm că factorul prim în această interdependență îl constituie activitatea catalazei, care, descompunînd rapid H_2O_2, împiedică formarea peroxizilor. Nu putem considera scăderea peroxidării ca fiind datorită exclusiv prezenței vitaminei E, deoarece aceasta este foarte scăzută în tumori, față de țesuturile normale.

Se pare că relația catalază-peroxizi este valabilă în special pentru țesuturile neiradiate (normale, tumorale). După iradiere, echilibrul natural se strică și găsim faze în care acumularea peroxizilor lipidici se face paralel cu revenirea spre normal a activității catalazei hepatice (zilele III—VII). De aceea, chiar dacă activitatea catalazică apare modificată după iradiere la intervale mai timpurii decît creșterea peroxizilor, nu o putem considera, totuși, factorul determinant al peroxidării în general, ci putem doar să-i atribuim un rol în inducerea vitezei de apariție a per-

oxizilor (zilele I—III). Dovada am făcut-o prin iradierea șobolanilor în prezența catalazei, în care caz inhibiția formării peroxizilor sub acțiunea catalazei este destul de slabă.

CONCLUZII

Problema relației catalază-peroxizi lipidici se pune în mod diferit pentru țesuturile iradiate și cele neiradiate. În țesuturile neiradiate (normale sau tumorale), o activitate catalazică crescută determină un conținut foarte scăzut în peroxizi lipidici. În țesuturile iradiate, intensitatea activității catalazei joacă un rol doar în determinarea vitezei de acumulare a peroxizilor în prima fază a iradierii, dar nu influențează reacțiile de peroxidare care se dezvoltă ulterior.

Prezentată la redacție
la 24 iunie 1964

Laboratorul de enzimologie
al Institutului oncologic București

BIBLIOGRAFIE

1. Z. M. BACQ, C. BURG, A. CHEVALIER, C. HEUSGHEM, J. Physiol. (Paris), **43**, *4*, 640 (1951).
2. M. FURNICĂ, Oncologia și radiologia, **I**, *6*, 557 (1962).
3. A. L. TAPPEL, H. ZALKIN, Arch. Biochem., **89**, *1—2*, 326 (1959).
4. O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ, V. DRAGON, R. DUȚU, Oncologia și radiologia, **I**, *3*, 205 (1962).
5. O. COSTĂCHEL, M. FURNICĂ, V. DRAGON, St. cerc. biochim., **V**, *2*, 219 (1962).
6. M. FURNICĂ, M. SPIRIDON, St. cerc. biochim., **V**, *3*, 447 (1962).
7. L. KOHN, I. LIVERSEDGE, J. Pharmacol. Exp. Therap., **82**, 292 (1944).
8. H. BLASCHKO, Biochem. J., **29**, 2303 (1935).
9. F. BERNHEIM, Radiation Research, *supl. 3*, 17 (1963).
10. R. FEINSTEIN, C. BUTLER, D. HENDLEY, Science, **111**, 149 (1950).
11. J. S. ROTH, H. J. EICHEL, A. WASE, K. ALPER, M. J. BOYD, Arch. Biochem. Biophys., **44**, *1*, 95 (1953).
12. B. N. GORODINSKI, P. V. VESELAIA, *Tezele Conferinței unionale de radiologie medicală.. Secția radiologie experimentală*, Moscova, 1956.
13. L. A. STOCKEN, Rad. Res. *supl. 1*, 53 (1959).
14. W. A. CREASEY, Biochem. J., **77**, 5 (1960).
15. W. FRIEDBERG, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **93**, 52 (1956).
16. J. G. KAPLAN, W. K. PAIK, J. Gen. Physiol., **40**, 147 (1957).
17. D. L. ARANSON, M. J. FRASER, C. L. SMITH, Rad. Res., **5**, 225 (1956).
18. M. FURNICĂ, G. DINESCU, P. NICOLESCU, V. SAPATINO, St. cerc. biochim., **VI**, *3*, 403 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 359 – 365 (1964)

DOZAREA PENTOZELOR ÎN LICHIDELE BIOLOGICE PRIN REACȚIA CU *o*-TOLUIDINĂ*

STELA GHEȚIE și ADRIANA CIOBA

612.122

Rezumat. — Pentozele reacționează specific cu *o*-toluidina, dînd o culoare roșie intensă, spre deosebire de hexoze care dezvoltă o culoare albastră.

Studiindu-se influența diferiților parametri care intervin în reacția dintre pentoze și *o*-toluidină în comparație cu reacția dintre hexoze și *o*-toluidină, s-a elaborat o metodă de lucru pentru dozarea pentozelor în lichidele biologice în prezența hexozelor.

Spre deosebire de arabinoză, xiloză și riboză, dezoxiriboza nu dă o reacție de culoare cu *o*-toluidina.

Metoda propusă este aplicabilă numai la dozarea pentozelor libere, nu și a celor legate în poliglucide.

Urinele patologice pot să conțină diferite zaharuri ca: glucoză, fructoză, lactoză, precum și unele pentoze. Uneori, pentru precizare de diagnostic este necesar să se facă identificarea tipului de glucid prezent în urina dată. Astfel, în formele grave ale diabetului zaharat, alături de glucoză, apare în urină și arabinoza racemică. Există însă unele pentozurii cronice care nu au nimic comun cu diabetul, cauzate de tulburări de natură necunoscută ale metabolismului acizilor nucleici. Administrarea unor medicamente (camfor, cloralhidrat etc.) sau ingerarea unor fructe bogate în pentoze poate determina și ea o pentozurie tranzitorie.

Pentozele apar în urină fie singure, fie alături de glucoză. În acest din urmă caz, pentru a le putea pune în evidență de exemplu prin reacția Bial [1], glucoza trebuie îndepărtată prin fermentație cu drojdie de bere.

R. W. Bailey [2] arată că pentozele pot fi dozate printr-o reacție de culoare cu antrona. J. H. Roe și E. W. Rice [3] propun pentru determinarea pentozelor reacția de culoare cu *p*-bromanilina, iar M. V. Tracey [4] recomandă anilina în același scop.

Toate aceste metode au următoarele inconveniente: pentozele dau cu reactivii de mai sus aceeași culoare ca și hexozele; dozarea pentozelor se face în anumite condiții de lucru, într-un timp strict delimitat; pentozele nu se pot doza în prezența hexozelor.

---

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba engleză.

E. Hultmann [5] comunică o reacție de culoare între hexoze și *o*-toluidină, recomandînd pentru determinarea glicemiei o metodă bazată pe această reacție.

Într-o notă anterioară [6], am arătat că și pentozele reacționează specific cu *o*-toluidina, dezvoltînd o culoare roșie, în timp ce hexozele produc o culoare albastră. Ne-am propus să elaborăm pe baza acestei reacții o metodă pentru determinarea pentozelor prin reacția cu *o*-toluidină și să studiem posibilitatea dozării pentozelor în prezența hexozelor.

Pentru stabilirea condițiilor de lucru, s-a urmărit influența diferiților parametri care intervin în cursul determinării asupra reacției dintre *o*-toluidină și pentoze. Parametrii studiați a fost următorii :

1) Concentrația *o*-toluidinei, acidului acetic și tioureei în reactiv.

2) Timpul de încălzire.

3) Absorbția culorii dezvoltate la lungimi de undă variabile.

De asemenea, s-a verificat legea lui Lambert-Beer pentru grosimi de strat diferite și pentru concentrații variabile ale soluției de analizat.

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat cu soluții de arabinoză și glucoză în concentrație de 100 mg/100 ml. S-a aplicat următoarea tehnică de lucru : la 0,1 ml soluție de cercetat s-au adăugat 3,9 ml reactiv ; proba se încălzește un timp determinat într-o baie marină ținută la fierbere, după care se răcește brusc. Aprecierea rezultatelor se face prin citire față de apă distilată la fotometrul Pulfrich, la lungimile de undă corespunzătoare (500 mμ pentru arabinoză și 610 m μ pentru glucoză). în cuva de 1 cm. Reactivul folosit este o soluție de *o*-toluidină în acid acetic glacial cu adaos de tiouree.

REZULTATE

Concentrația în o-toluidină a reactivului. S-a constatat că există o concentrație limită peste care excesul de *o*-toluidină nu modifică rezultatele (fig. 1).

Extincția maximă pentru pentoze se obține cu un reactiv ce conține 4% *o*-toluidină în acid acetic glacial (v/v). Creșterea concentrației în *o*-toluidină peste această valoare nu schimbă rezultatele. Hexozele dau valori plafonate numai pentru un reactiv ce conține peste 6% *o*-toluidină.

Din compararea extincțiilor se observă de asemenea că pentozele dau reacție mai intensă, întrucît soluția de arabinoză (de aceeași concentrație cu soluția de glucoză) dezvoltă o culoare roșie, a cărei intensitate este net superioară față de intensitatea culorii albastre dată de glucoză.

Concentrația acidului acetic. Cantitatea de apă prezentă în amestecul de reacție are o influență considerabilă asupra reacției pe care o dau cu *o*-toluidina pentozele și hexozele (fig. 2).

Se vede astfel că cele mai mari valori corespund reactivului preparat cu acid acetic glacial (100%). (În mod arbitrar, acidul acetic glacial Stas 1409-60 de concentrație 96% s-a considerat de 100%).

Reactivul care conține numai 50% acid acetic produce o scădere apreciabilă a intensității culorii de reacție. Extincția găsită pentru ara-

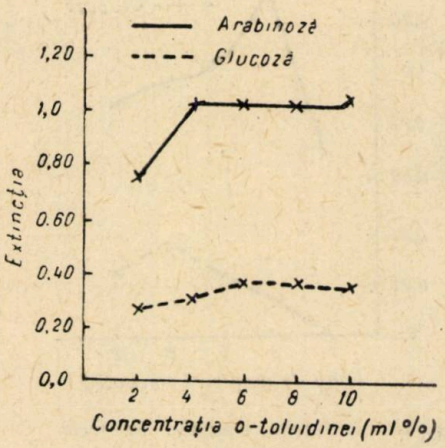


Fig. 1. — Influența concentrației *o*-toluidinei în reactiv.
Acid acetic glacial; tiouree 0,5 g %
Timp de încălzire 8′.

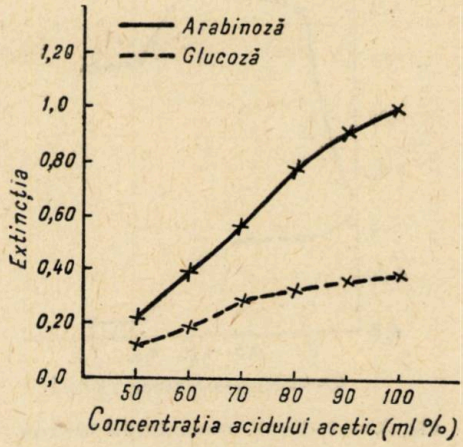


Fig. 2. — Influența concentrației acidului acetic în reactiv.
o-toluidină 6%; tiouree 0,5 g %
Timp de încălzire 8′.

binoză în acest caz este de aproape 5 ori mai mică, iar pentru glucoză de aproximativ trei ori mai mică decît cea obținută cu reactiv care conține 100% acid acetic. Din acest motiv am ales un raport între reactiv și probă cît mai mare posibil (3,9 ml reactiv +0,1 ml probă).

Concentrația în tiouree a reactivului. Deoarece reactivul cu *o*-toluidină nu este stabil fără adaos de tiouree (nu furnizează rezultate reproductibile), s-a urmărit dacă aceasta intervine în reacție și în ce măsură (fig. 3).

Se observă că, în cazul arabinozei, adaosul de tiouree influențează puternic reacția de culoare; pentru o concentrație de 1% tiouree se obține extincția maximă, după care valorile citite sînt mai scăzute.

Glucoza se comportă diferit, întrucît extincția maximă se obține pentru reactivul liber de tiouree. Pentru motivele arătate mai sus [7], se preferă totuși un reactiv care conține tiouree între 0,1 și 0,5 %, deși în acest interval de concentrație valorile citite sînt ușor scăzute.

Timpul de încălzire. Reacția de culoare dată de monoglucide în prezența reactivului cu *o*-toluidină se desfășoară la cald. Este necesar ca monoglucidele, împreună cu soluția acetică de *o*-toluidină să fie încălzite un timp determinat în baie marină ținută la fierbere. Studiindu-se influența duratei de încălzire asupra intensității colorației date, s-a con-

statat că pentozele dau extincția maximă la 3 min, în vreme ce hexozele ating valoarea maximă la 9 min (fig. 4).

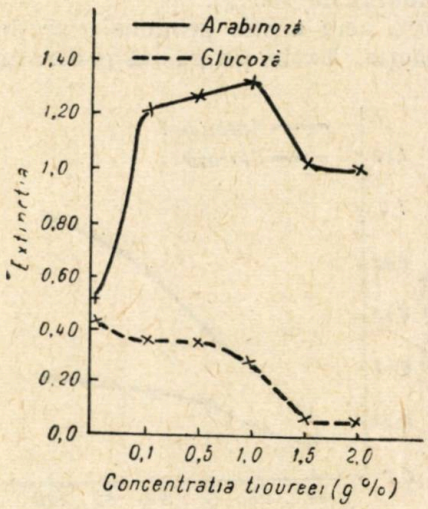


Fig. 3. — Influența concentrației tioureei în reactiv.

Acid acetic glacial; *o*-toluidină 6%; Timp de încălzire 8′.

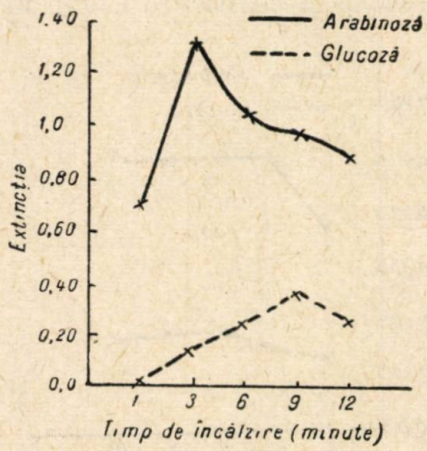


Fig. 4. — Influența timpului de încălzire.

Arabinoză: *o*-toluidină 4%; tiouree 1 g %; Glucoză: *o*-toluidină 6%; tiouree 0,5 g %.

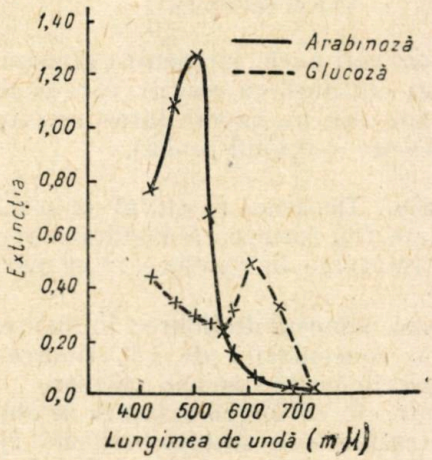


Fig. 5. — Curbele de absorbție pentru arabinoză și glucoză.

Acid acetic glacial. Arabinoză: *o*-toluidină 4%; tiouree 1 g %; timp de încălzire 3′ Glucoză: *o*-toluidină 6%; tiouree 0,5 g %; timp de încălzire 9′.

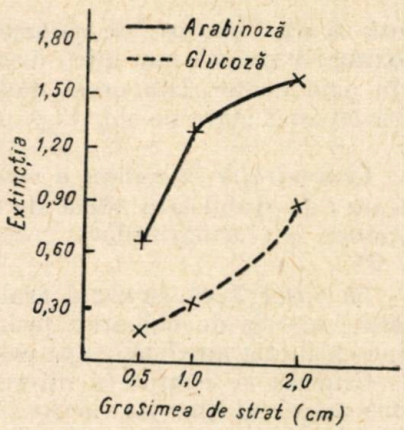


Fig. 6. — Verificarea legii Lambert-Beer pentru diferite grosimi de strat.

Acid acetic glacial. Arabinoză: *o*-toluidină 4%; tiouree 19%; timp de încălzire 3′ Glucoză: *o*-toluidină 6%; tiouree 0,5 g%; timp de încălzire 9′.

Prelungirea timpului de încălzire produce în ambele cazuri scăderea intensității culorii.

Curbele de absorbție. Curba de absorbție pentru arabinoză înregistrează un singur maxim la lungimea de undă de 500 mμ, iar cea pentru glucoză prezintă două maxime, unul la lungimea de undă de 420 mμ, iar celălalt la 610 mμ (fig. 5).

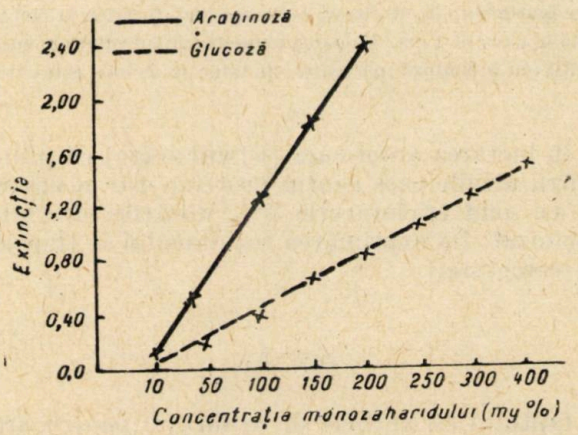


Fig. 7. — Verificarea legii Lambert-Beer pentru concentrații variabile.

Acid acetic glacial. Arabinoză : *o*-toluidină 4% ; tiouree 1 g% ; timp de încălzire 3′. Glucoza : *o*-toluidină 6% ; tiouree 0,5 g % ; timp de încălzire 9′.

Pentru concentrații de glucoză cuprinse între 10 și 100 mg /100 ml, cele două maxime sînt practic egale, iar pentru valori care depășesc 100 mg/100 ml maximul de la 610 mμ este mai pronunțat, astfel că se recomandă ca citirile pentru glucoză să fie făcute la 610 mμ (cu filtrul S_{61}).

Verificarea legii lui Lambert-Beer. Din figura 6 se vede că, pentru o grosime de strat cuprinsă între 0,5 și 1 cm, se păstrează proporționalitatea atît pentru soluția de arabinoză (100 mg/100 ml) cît și pentru cea de glucoză (100 mg/100 ml).

Intervalul de concentrație pentru care este valabilă legea lui Lambert-Beer (fig. 7) este cuprins în cazul glucozei între 10 și 400 mg/100 ml ($d = 1$ cm), iar pentru arabinoză între 5 și 200 mg/100 ml ($d = 1$ cm).

Sensibilitatea metodei poate fi crescută pentru arabinoză, prin mărirea grosimii de strat; utilizînd cuva de 2 cm, se poate construi o curbă etalon pentru concentrații cuprinse între 0,5 și 10 mg/100 ml.

TEHNICA DE LUCRU RECOMANDATĂ

Din analiza rezultatelor referitoare la influența exercitată de parametrii studiați asupra reacției dintre pentoze și *o*-toluidină, se impune următoarea tehnică de lucru, pe care o recomandăm la dozarea pentozelor în lichidele biologice.

Reactivul. Se prepară o soluție de 4% *o*-toluidină în acid acetic glacial (v/v), la care se adaugă 1% tiouree (g/v). Reactivul se prepară cu 24 de ore înainte de întrebuințare și se păstrează bine 2—3 luni la temperatura camerei, ferit de lumina directă.

Procedeu. La 0,1 ml din proba de analizat se adaugă 3,9 ml reactiv. Amestecul se încălzește timp de 3 min într-o baie marină ținută la fierbere, apoi se răcește brusc, iar culoarea dezvoltată, care este foarte stabilă, se citește la fotometrul Pulfrich la 500 mμ. Citirea se face față de apă distilată în cuva de 1 cm. Valoarea extincției se introduce în curba etalon, construită în aceleași condiții (cu o pentoză oarecare), de unde se deduce concentrația pentozelor din produsul analizat.

Deoarece în lucrarea anterioară [6] am arătat că proteinele modifică rezultatele, pentru urinile care conțin proteine este necesară o deproteinizare prealabilă cu acid tricloracetic 3%, dozările efectuîndu-se apoi în filtratul deproteinizat. La exprimarea rezultatului se ține seama de diluția aplicată urinii cercetate.

DISCUȚII

Datorită faptului că curbele de absorbție pentru arabinoză și glucoză prezintă maxime la lungimi de undă diferite, este posibil să se determine concentrația pentozelor în lichidele biologice care conțin și glucoză.

Într-o soluție mixtă de arabinoză și glucoză în care cantitatea de glucoză nu depășește 20% din cantitatea de arabinoză, aceasta din urmă se poate doza prin citirea extincțiilor la 500 mμ, fără ca rezultatele să fie influențate de prezența glucozei.

Pentozele se pot doza în prezența hexozelor și cînd acestea depășesc 20% din cantitatea celor dintîi, dacă se reduce timpul de fierbere. După cum s-a arătat, în prezența reactivului cu *o*-toluidină arabinoza dezvoltă culoarea după 1 min de încălzire în baia marină, spre deosebire de glucoză cu care culoarea apare abia după 3 min de încălzire. Ținînd cont de aceasta, se poate construi o curbă etalon pentru arabinoză la timpul de încălzire de 1 min și astfel se creează posibilitatea determinării pentozelor în prezența hexozelor.

Mecanismul care stă la baza reacției dintre monoglucide și *o*-toluidină este următorul: acidul acetic, la cald, determină formarea de furfurol sau de derivați ai acestuia. Pentozele sînt transformate în furfurol, iar hexozele în hidroximetilfurfurol. Aceștia dau cu *o*-toluidina reacții de culoare specifice. Furfurolul reacționează cu *o*-toluidina la rece și instantaneu, iar produsul rezultat este colorat în roșu. Dacă o soluție de arabinoză este fiartă timp de 3 min în mediu de acid acetic glacial și apoi răcită, ea reacționează cu *o*-toluidina în mod analog, ceea ce constituie o dovadă pentru mecanismul de reacție presupus.

În mediu de acid acetic la cald, pentozele și hexozele se transformă în derivați furanici numai dacă se găsesc în stare liberă. De aceea, metoda cu *o*-toluidină propusă nu poate servi la dozarea poliglucidelor alcătuite din pentoze sau hexoze. Acizii clorhidric și sulfuric, care determină for-

marea de derivați furanici și din pentozele sau hexozele legate într-un poliglucid oarecare, nu pot fi folosiți pentru prepararea reactivului cu *o*-toluidină deoarece provoacă anularea reacției de culoare.

S-a constatat că, dintre pentoze, în afară de arabinoză mai reacționează cu *o*-toluidina în mod analog xiloza și riboza. Dezoxiriboza nu dă această reacție nici pentru concentrații care ating 500 mg dezoxiriboză/100 ml. Acest fapt confirmă de asemenea mecanismul de reacție descris, întrucît dezoxiriboza nu are funcția hidroxil la carbonul 2 și deci nu poate fi transformată în furfurol. Această comportare poate fi folosită la diferențierea celor două pentoze, riboza și dezoxiriboza, prezente în acizii nucleici.

Prin aplicarea metodei cu *o*-toluidină la unele urini (unde s-a semnalat prezența glucidelor), s-au putut pune în evidență și doza pentozele. Acest rezultat, corelat cu alte date clinice și de laborator, a permis excluderea unor diagnostice prezumtive ca diabetul zaharat sau insipid.

CONCLUZII

1. S-a semnalat că pentozele reacționează specific cu *o*-toluidina, dînd o culoare roșie intensă.

2. S-au studiat condițiile de reacție dintre pentoze și *o*-toluidină în comparație cu reacția hexozelor cu același reactiv. Rezultatele obținute au permis să se elaboreze cea mai adecvată tehnică de lucru pentru dozarea pentozelor în lichidele biologice.

3) Pentozele reacționează mai puternic cu *o*-toluidina. Limita de sensibilitate a metodei este de 5 μg pentoze/ml. Reacția este influențată considerabil de cantitatea de apă prezentă în amestecul de reacție.

4) Tehnica elaborată permite dozarea pentozelor și în prezența hexozelor, dacă acestea din urmă nu depășesc 20% din întreaga cantitate de pentoze. Chiar la concentrații mai mari de 20% pentozele pot fi dozate, dacă timpul de încălzire se reduce la 1 min (hexozele reacționează cu *o*-toluidina numai după 3 min de încălzire).

5. Dintre pentozele studiate, arabinoza, xiloza și riboza reacționează cu *o*-toluidina, iar dezoxiriboza nu dă o reacție de culoare cu acest reactiv.

6. Metoda propusă se aplică numai pentru monoglucide.

Prezentată la redacție
la 25 mai 1964

Laboratorul de biochimie al Spitalului clinic de pediatrie „Emilia Irsa", București

BIBLIOGRAFIE

1. Z. DISCHE, K. SCHWARZ, Mikrochim. Acta, **2**, 13 (1937).
2. R. W. BAILEY, Biochem. J., **68**, 669 (1958).
3. J. H. ROE, E. W. RICE, J. biol. Chem., **173**, 507 (1948).
4. M. V. TRACEY, Biochem. J., **47**, 433 (1950).
5. E. HULTMANN, Nature, **183**, 4654, 108 (1958).
6. S. GHEȚIE, E. TRIPCOVICI, Rev. roum. Biochim., **1**, 2, p 143 (1964).
7. A. HYVÄRINEN, E. A. NIKKILÄ, Clin. chim. Acta, **7**, 140 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 367 – 374 (1964)

LOCALIZAREA CRIOPROTEINELOR ÎN SEMINȚE *

VICTOR GHEȚIE și LUCIA BUZILĂ

581.19

Rezumat. — Crioproteinele sînt distribuite neuniform, fiind concentrate numai în anumite părți ale semințelor, în special în cotiledoane.

Crioproteinele sînt prezente chiar în semințele ale căror extracte apoase nu prezintă crioprecipitare. În aceste cazuri, absența crioprecipitării este provocată de localizarea crioproteinelor în acele părți ale semințelor care nu reprezintă decît un procent mic din sămînța întreagă.

Rezultatele obținute întăresc presupunerea autorilor că mecanismul de reglare a germinației, în raport cu temperatura mediului ambiant, se realizează prin intermediul proteinelor la majoritatea plantelor superioare.

Crioproteinele există în semințe sub forma unor asociații cu lipidele, fiecare tip de crioproteină legînd o cantitate caracteristică de lipide, cuprinsă între 2 și 10%. Se discută posibilitatea ca precipitarea la rece a crioproteinelor să fie cauzată de componentul lipidic.

Crioproteinele vegetale sînt o categorie de proteine înzestrate cu proprietatea de a precipita prin răcirea extractelor apoase în care sînt dizolvate [1], [2], [3]. Aceste proteine sînt prezente numai în semințe, lipsind din celelalte organe ale plantelor [2].

În lucrări anterioare [4], [5], noi am formulat o ipoteză cu privire la intervenția crioproteinelor în germinație, aducînd totodată date experimentale în sprijinul ei. Potrivit ipotezei, proprietatea crioproteinelor de a-și micșora considerabil solubilitatea prin scăderea temperaturii constituie principalul mecanism prin care semințele germinate își autoreglează metabolismul în raport cu temperatura mediului ambiant.

Intervenția crioproteinelor poate fi schițată astfel: prin scăderea temperaturii în protoplasma semințelor germinate se declanșează fenomenul de crioprecipitare. Insolubilizarea treptată a crioproteinei produce o alterare reversibilă a structurii protoplasmei, ceea ce determină o micșorare a vitezei de germinație. Dacă temperatura continuă să scadă, coborînd sub temperatura minimă de germinație a semințelor respective, crioprecipitarea este atît de intensă, încît blochează procesele biochimice interesate în germinație. Invers, dacă temperatura crește, crioproteinele re-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba franceză.

intră treptat în protoplasmă; „redizolvarea" crioproteinelor deblochează procesele biochimice și germinația semințelor reîncepe.

Crioproteinele au fost semnalate în semințele majorității plantelor cercetate. De aceea am presupus că mecanismul de reglare a germinației prin intermediul crioproteinelor este general. Existența unor semințe la care n-am reușit să evidențiem crioproteinele (toate semințele gramineelor și unele specii de compozite) punea totuși la îndoială caracterul general al reglării germinației prin crioprecipitare. Cum era puțin probabil să existe în sînul aceleiași familii specii care să aibă mecanisme diferite de reglare a germinației, se putea pune întrebarea dacă nu cumva prezența crioproteinelor în semințe este lipsită de semnificație metabolică.

Analizînd rezultatele obținute, am ajuns la concluzia că crioproteinele pot fi prezente chiar în semințele ale căror extracte apoase n-au prezentat crioprecipitare și că absența crioprecipitării poate fi explicată prin localizarea diferențiată a crioproteinelor în semințele respective*. În aceste cazuri, crioproteinele pot fi localizate în părțile seminței care nu reprezintă decît un procent mic din sămînța întreagă. Din această cauză, extractele apoase totale vor conține crioproteine într-o cantitate insuficientă pentru manifestarea crioprecipitării.

Această explicație implică distribuția neuniformă a crioproteinelor în părțile constitutive ale seminței. Ea poate fi verificată prin studiul localizării crioproteinelor, sarcină pe care ne-am luat-o în această lucrare.

MATERIAL ȘI METODĂ

S-au folosit semințe din familia leguminoase (soia, bob, mazăre, măzăriche și fasole), cucurbitacee (dovleac și castravete), euforbiacee (ricin), malvacee (bumbac), compozite (floarea-soarelui) și graminee (porumb) din recoltele anilor 1962 și 1963. Separarea endospermului de embrion și a embrionului în cotiledoane, pe de o parte, și gemulă, tulpiniță și radiculă, pe de altă parte, s-a făcut manual, după o imbibiție prealabilă a semințelor, timp de 24—48 de ore, în apă distilată. Separarea cotiledoanelor de restul embrionului cere o atenție deosebită pentru a nu se impurifica restul embrionului cu fragmente de cotiledon. Materialele izolate s-au uscat în exsicatorul de vid peste clorură de calciu.

Extracția proteinelor. Făina obținută prin mojararea diferitelor părți ale semințelor s-a extras cu apă bidistilată, folosind un raport de 1 parte făină la 5 părți de apă. Operația s-a efectuat la temperatura camerei, timp de 30 de min, cu agitare continuă. Extractele s-au centrifugat la temperatura camerei, timp de 15 min la 15 000 g. Supernatantele limpezi au fost folosite pentru detectarea crioproteinelor și la diferite determinări.

Dozarea crioproteinelor. 1 ml din extractul limpede care conține crioproteine a fost ținut timp de 3 ore într-o baie de gheață (1—4°C). S-a centrifugat apoi extractul la 1—4°C, timp de 30 min la 5 000 g. Se depun crioproteinele. Se îndepărtează supernatantul, iar precipitatul se spală la suprafață de cîteva ori cu apă bidistilată rece și apoi se usucă în exsicatorul de vid peste clorură de calciu. Crioproteinele uscate se dizolvă în 0,25 ml NaOH 0,1 N și se

* Sămînța plantelor este alcătuită din trei părți principale: tegumentul, endospermul și embrionul. Embrionul, la rîndul său, se compune din gemulă, tulpiniță, radiculă și cotiledoane. Proporția cantitativă a părților ce alcătuiesc sămînța variază de la specie la specie.

determină concentrația proteică a soluției. Procentul crioproteinelor din cantitatea totală de proteină extrasă s-a calculat cu formula : 100 $C/4$ P, unde P = concentrația proteică a extractului total (g%), C = concentrația proteică a soluției alcaline de crioproteină (g%), iar cifra 4 arată că crioproteina s-a reluat într-un volum de 4 ori mai mic decît cel inițial.

Filtrarea prin gel de Sephadex. S-a folosit tipul G-25, cu care s-a umplut o coloană de 17/1,7 cm. S-au introdus 2 ml de extract și s-a eluat cu o soluție de clorură de sodiu 0,145 M. Viteza de eluție : 60 ml/oră.

S-au colectat fracțiuni de cîte 2 ml. Concentrația proteică a fracțiunilor s-a determinat spectrofotometric la 280 mμ. Majoritatea proteinelor au fost eluate în primii 20 ml. Unele fracțiuni s-au concentrat de 4—5 ori prin tratare cu Sephadex G-25 uscat [6].

Determinarea conținutului în lipide al crioproteinelor și al proteinelor totale. Crioproteinele obținute în urma a 2—3 reprecipitări la rece din soluția de clorură de sodiu 0,145 M se usucă în exsicatorul de vid peste clorură de calciu. Proteina uscată, fin mojarată, se extrage de două ori cu eter de petrol, la temperatura camerei. Fiecare extracție durează o oră, cu agitare continuă. Se elimină astfel lipidele libere, nelegate de crioproteină. Se îndepărtează eterul de petrol și proteina se lasă să se usuce la temperatura camerei. Se prepară apoi o soluție cu o concentrație cunoscută, prin dizolvarea crioproteinei într-un volum determinat de NaOH 0,1 N. În această soluție se determină cantitatea de proteine și de lipide. Din valorile obținute se calculează procentul de lipide al fiecărei crioproteine cercetate.

Proteinele totale s-au obținut din extractul apos total, prin precipitare cu acid tricloracetic 10%. Proteinele precipitate, spălate și uscate, au fost apoi prelucrate la fel ca crioproteinele.

Proteinele s-au determinat prin micrometoda cu albastru de bromfenol [7], controlată cu metoda biuretului [8], folosind în ambele cazuri o curbă-etalon construită cu proteina totală extrasă din cotiledoanele de bob (*Vicia faba*).

Lipidele au fost dozate prin micrometoda cu negru Sudan B, folosind ca etalon o soluție de trioleină [9].

Glucidele (*substanțele reducătoare*) s-au dozat prin metoda Hagedorn-Jensen modificată, care permite măsurarea unor cantități mai mari de glucide [10].

Substanțele minerale globale s-au determinat conductometric. S-a folosit o celulă conductometrică tip Arrhenius, atașată la un conductoscop. Determinările s-au făcut la 25°C. Calculele s-au efectuat după formula : $\lambda = K/R_x - \lambda_a$, unde K = constanta celulei (0,0475), λ_a = conductibilitatea apei bidistilate și R_x = rezistența măsurată (în ohmi).

pH-ul s-a măsurat cu ajutorul hîrtiilor indicatoare (Spezial-Indicator Papier, Merck și pH-AN Chemapol) și prin metoda electrometrică.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetarea crioprecipitării în extractele obținute din diferitele părți ale semințelor a confirmat pe deplin ipoteza noastră de lucru : crioproteinele sînt concentrate numai în anumite părți ale semințelor.

Astfel, în semințele tuturor leguminoaselor (bob, măzăriche, mazăre, fasole și soia) și cucurbitaceelor (dovleac, castravete) cercetate, crioproteinele au fost puse în evidență numai în cotiledoane. S-au mai evidențiat crioproteine în endospermul de ricin și în cotiledoanele de floarea-soarelui, bumbac și varză. Cum cotiledoanele, respectiv endospermul la ricin, ocupă cea mai mare parte din masa acestor semințe, rezultă clar că în

extractul total crioproteinele se găsesc în cantitate suficient de mare pentru manifestarea crioprecipitării. La graminee, crioproteinele au fost detectate numai în *scutelum* (cotiledon). Deoarece *scutelum*-ul reprezintă doar 5% din întreaga sămînță, concentrația crioproteinelor în extractele obținute din sămînța întreagă este sub limita de manifestare a crioprecipitării. De aceea în lucrările noastre anterioare am constatat absența crioprecipitării în extractele apoase obținute din semințele de porumb [2].

Rezultatele obținute ne-au întărit convingerea că crioproteinele sînt prezente și în semințele ale căror extracte totale n-au manifestat crioprecipitare. În aceste semințe crioproteinele sînt concentrate în acele părți ale semințelor care nu reprezintă decît un procent mic din sămînța întreagă.

Această concluzie se bazează pe testarea crioprecipitării extractelor obținute din diferite părți ale seminței. Dar crioprecipitarea este inhibată de concentrații mari de glucide (>0,40 M) și substanțe minerale(> 0,15M) sau pH-uri mai mari de 7,5 [4]. De aceea ar fi posibil ca, în extractele care n-au precipitat la rece, crioproteinele să fie „mascate" prin concentrații ridicate de glucide, săruri minerale sau pH-uri alcaline. Pentru a elimina această obiecție din calea interpretării rezultatelor obținute, am urmărit acești parametri în extractele obținute din părțile principale ale unor semințe. Rezultatele sînt înfățișate în tabela nr. 1.

Tabela nr. 1

Variația crioproteinelor, proteinelor, glucidelor, substanțelor, minerale și pH-ului în extractele apoase obținute din diferite părți ale seminței

Sămînța	Partea separată	Crioproteine (% din proteina extrasă)	Proteine (g%)	Glucide (ml $S_2O_3Na_2$ N/100 la 0.1 ml de extract)	Substanțe minerale (conductibilitatea extractelor diluate 1/25; $\times 10^{-5}\Omega^{-1}$ cm^{-1})	pH
Soia	cotiledoane	25	1,06	3,85	42,0	6,7
(*Soia hispida*)	rest embrion*	0	1,22	7,51	71,4	6,7
Mazăre	cotiledoane	28	0,96	2,11	31,0	6,4
(*Pisum sativum*)	rest embrion	0	1,08	7,56	97,0	7,0
Ricin **	cotiledoane	0	0,97	3,56	12,9	6,0
(*Ricinus communis*)	rest embrion	0	0,64	7,16	—	—
	endosperm,	14	0,70	1,40	5,5	5,9
Dovleac	cotiledoane	17	1,14	1,07	21,6	6,6
(*Cucurbita maxima*)	rest embrion	0	0,84	10,32	284,1	6,9
Porumb	cotiledoane	22	1,26	1,33	21,5	6,7
(*Zea mays*)	rest embrion	0	1,90	1,52	19,3	6,5
	endosperm	0	0,20	0,75	5,0	5,4

* Sub denumirea de *rest embrion* au fost cuprinse gemula, tulpinița și radicula, luate împreună.

** Extractele de ricin s-au obținut din 1 parte de făină/10 părți de apă. Celelalte extracte au fost preparate din 1 parte de făină/5 părți de apă.

Datele tabelei arată că, la soia, mazăre și dovleac, extractele din restul embrionului conțin o cantitate de glucide și substanțe minerale de 3 —10

ori mai mare decît extractele obținute din cotiledon. De asemenea, la ricin, cotiledoanele și restul embrionului conțin o cantitate mai mare de glucide și substanțe minerale decît endospermul. Numai la porumb aceste substanțe sînt în cantitate asemănătoare în restul embrionului și *scutelum*. În toate cazurile, pH-ul extractelor care nu crioprecipită este mai mare decît al celorlalte extracte, fără a intra totuși în zona alcalină care inhibă crioprecipitarea.

Aceste rezultate arată că prezența crioproteinelor ar putea fi „mascată" în extractele cu un conținut ridicat în glucide și substanțe minerale. Pentru a preciza dacă în extractele care n-au crioprecipitat concentrațiile de glucide și substanțe minerale împiedică într-adevăr evidențierea crioproteinelor, am procedat la îndepărtarea lor parțială din extracte. În acest scop am dializat extractele obținute din restul embrionului de mazăre și embrionul de ricin față de apa distilată. Eliminarea componentelor minerale și glucidice dializabile s-a făcut numai parțial, pentru a nu determina precipitarea proteinelor prin desalifiere. La diferite intervale de timp s-au luat probe în care s-a determinat pH-ul, glucidele și substanțele minerale. Extractele din embrionul de ricin, ca și cele din restul embrionului de mazăre, n-au crioprecipitat în urma dializei nici prin scăderea concentrației glucidelor și substanțelor minerale chiar sub nivelul constatat la formațiunile care prezintă crioprecipitare. Rezultatele pentru mazăre sînt prezentate în tabela nr. 2.

Tabela nr. 2

Eliminarea parțială a glucidelor și substanțelor minerale din extractele apoase obținute din restul embrionului de mazăre (*Pisum sativum*)

Partea din sămînță și operația efectuată	Proteine (g%)	Glucide (ml $S_2O_3Na_2$ N/100 la 0,1 ml)	Substanțe minerale (conductibilitate $\times 10^{-5}\Omega^{-1}cm^{-1}$)	pH	Crioprecipitare
Rest embrion nedializat	1,08	7,56	97,0	7,0	absentă
Rest embrion dializat	1,00	1,28	17,2	6,6	absentă
Cotiledoane (martor)	0,96	2,11	31,0	6,4	prezentă

Extractele obținute din restul embrionului de soia, dovleac și fasole nu pot fi eliberate în chip satisfăcător de glucide și substanțe minerale prin dializă față de apa distilată. De aceea din aceste extracte s-au eliminat complet glucidele și substanțele minerale, prin filtrare peste gel de Sephadex G-25 (reține toate moleculele cu o greutate moleculară mai mică de 5 000). Eluția s-a efectuat cu o soluție de clorură de sodiu 0,145 M, deoarece în acest mediu crioprecipitarea se produce cu o intensitate ușor observabilă.

S-a constatat că eluatele proteice obținute din cotiledoane prezintă crioprecipitare, în timp ce eluatele obținute din restul embrionului nu au crioprecipitat nici chiar după concentrarea de 4—5 ori a soluțiilor. În frac-

țiunile eluate, în afară de clorură de sodiu 0,145 M, nu există nici alte săruri și nici glucide.

Se poate deci considera ca demonstrată absența crioproteinelor în restul embrionului, datele obținute sprijinind concluzia noastră cu privire la localizarea crioproteinelor numai în anumite părți ale semințelor.

Această constatare impune reexaminarea unor rezultate mai vechi, obținute prin studierea extractelor din sămînța întreagă. Absența crioprecipitării în aceste extracte poate să indice localizarea lor în părțile semințelor a căror proporție cantitativă este mică în raport cu masa seminței întregi. În consecință, crioproteinele pot fi răspîndite în semințele tuturor plantelor. Această concluzie este deosebit de utilă pentru întărirea ipotezei noastre cu privire la rolul crioproteinelor în germinația semințelor [5].

Cantitatea de crioproteine prezentă în diferite extracte variază de la sămînță la sămînță. Nu s-a putut stabili vreo legătură între procentul lor relativ și concentrația glucidelor și substanțelor minerale în extracte (tabela nr. 1). Valoarea găsită pentru soia este în bună concordanță cu datele lui W. J. Wolf și D. R. Briggs [11], care găsesc că fracțiunea insolubilă la rece reprezintă 26 % din azotul proteic total al extractului apos.

Indiferent de partea de sămînță în care sînt localizate, crioproteinele sînt întotdeauna asociate cu lipidele. Fiecare tip de crioproteină leagă o cantitate determinată de lipidă, a cărei valoare nu depinde de conținutul în lipide libere al seminței respective (tabela nr. 3).

Tabela nr. 3

Variația cantității de lipide legate de diferite crioproteine

Sămînța	Cantitatea de lipide (mg/g proteină) din		Raport crioproteine/ proteină totală
	crioproteină	proteină totală	
Soia	58	87	0,67
Mazăre	93	48	1,95
Bob	24	28	0,87
Dovleac	60	68	0,87
Porumb	56	54	1,04

Cantitatea de lipide legate de crioproteine este diferită de cea cuprinsă în proteina totală, ceea ce indică individualitatea lor chimică. Lipidele sînt strîns legate de partea proteică a moleculei; încercările noastre de a disocia lipidele de proteine folosind metoda cu *n*-butanol [12] n-au avut succes, deși s-au aplicat toate procedeele utilizate curent (extracția proteinei liofilizate, extracția proteinei dizolvate prin procedeul cu două faze și cu o singură fază). Aceste rezultate sugerează că legarea lipidelor de crioproteine este realizată prin legături chimice de tip salin, care nu pot fi desfăcute prin acțiunea *n*-butanolului.

Conjugatul lipoproteic nu se desface nici în urma proceselor hidrolitice care acompaniază germinația. Astfel, urmărind germinația semințelor de bob (*Vicia faba*) timp de 18 zile, n-am constatat modificări semnificative ale raportului lipide/proteine, oscilant în jurul valorii 25 mg de lipidă/g de proteină.

Partea lipidică ar putea conferi moleculei proteice proprietatea de a-și modifica considerabil solubilitatea în funcție de temperatură. În acest caz, deosebirea dintre crioproteina dintr-o parte a seminței și unele proteine din celelalte părți ar putea fi determinată doar de componentul lipidic. În sprijinul acestei presupuneri pot fi aduse rezultatele noastre anterioare [13], care au arătat că între diferitele părți ale embrionului de bob (cotiledoane, gemulă, tulpiniță + radiculă) nu există deosebiri sesizabile prin metode imunochimice. Identitatea imunochimică constatată între diferitele părți ale seminței de bob, cu toate că crioproteinele sînt localizate doar în cotiledoane, pare să indice că aceste crioproteine n-au o structură antigenică distinctă de aceea a unor componente proteice din restul embrionului. Aceste componente din restul embrionului și crioproteinele din cotiledoane pot avea caractere imunochimice comune, diferențele fiind determinate doar de componentul lipidic.

În lumina acestor presupuneri apare utilă găsirea condițiilor experimentale de desfacere a lipidelor, fără alterarea structurii crioproteinelor și cercetarea comportării lor la temperaturi scăzute. Această problemă va fi studiată în viitor.

CONCLUZII

1. Crioproteinele sînt distribuite neuniform în semințe, fiind concentrate doar în anumite părți ale lor. În majoritatea cazurilor, crioproteinele sînt localizate în cotiledoane. În endosperm au fost identificate doar la ricin.

2. Fenomenul de crioprecipitare se manifestă în extractele obținute din sămînța întreagă, în funcție de concentrația crioproteinelor. Dacă crioproteinele sînt localizate doar în părțile constitutive, care ocupă un loc mic în masa întregii semințe, concentrația lor în extractele totale va fi insuficientă pentru manifestarea crioprecipitării. În aceste cazuri, crioprecipitarea se evidențiază numai în extractele obținute din părțile constitutive ale semințelor, luate separat.

3. Crioproteinele pot fi prezente în semințele tuturor plantelor. Pentru identificarea lor trebuie folosite extracte obținute din părțile componente ale seminței și nu din sămînța întreagă.

4. Crioproteinele sînt răspîndite în semințe sub forma unor asociații cu lipidele. Fiecare tip de crioproteină leagă o cantitate caracteristică de lipide (între 2 și 10%). Legarea lipidelor este realizată prin legături chimice de tip salin, nedisociabile prin *n*-butanol.

Prezentată la redacție
la 10 iunie 1964

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

BIBLIOGRAFIE

1. D. BRIGGS, L. MANN, *An electrophoretic analysis of soybean proteins*, Cereal chem., **27**, 243 (1950).
2. V. GHEȚIE, L. BUZILĂ, *Crioproteinele vegetale*, St. cerc. biochim., **5**, 65 (1962).

3. A. ROSSI-FANELLI, E. ANTONINI, M. BRUNORI, M. R. BRUZZESI, *Isolation of a monodisperse protein fraction from cottonseeds*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **15**, 110 (1964).
4. V. GHETIE, L. BUZILĂ, *Die Kryoausfällung in den plasmatischen Säften einiger Samen*, Rev. roum. Biochim., **1**, 41 (1964).
5. V. GHETIE, *Pflanzenkryoproteine und ihre Rolle in der Samenkeimung*, în *Internationales Symposium Physiologie, Ökologie und Biochemie der Keimung*, Greifswald, 1963, **A VII**, *C 4*.
6. P. FLODIN, B. GELOTTE, J. PORATH, *A method for concentrating solutes of high molecular weight*, Nature, **188**, 493 (1960).
7. L. M. DZIALOSZYNSKI, *Colorimetric microdetermination of protein*, în *IV-th International Congress of Biochemistry*, Viena, sect. *17—13*, 199 (1958).
8. T. E. WEICHSELBAUM, *An accurate and rapid method for the determination of proteins in small amounts of blood serum and plasma*, Am. J. Clin. Path. Techn. Sect., **10**, 40 (1964).
9. B. SWANN, *Studies on blood lipids*, Scand.J. Clin, Lab. Invest., **5**, *supl.* 9 (1953).
10. CH. S. HANES, *An application of the method of Hagedorn-Jensen to the determination of larger quantities of reducing sugars*, Biochem. J., **23**, 99 (1929).
11. W. J. WOLF, D. R. BRIGGS, *Purification and characterization of the 11 S component of soybean proteins*, Arch. Biochem. Biophys., **85**, 186 (1959).
12. R. K. MORTON, *Methods of extraction of enzymes from animal tissues*, în *S. P. Colowich, N. O. Kaplan, Methods in enzymology*, **I**, Acad. Press, New York, 1955, 25.
13. V. GHETIE, L. BUZILĂ, *The modification of antigen properties of tissues during seed germination and development of horse bean plants* (*Vicia faba*), Biologia Plantarum, **6**, 202 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 375 – 383 (1964)

NIVELUL FOSFOCREATINEI DUPĂ ADMINISTRAREA, RESPECTIV IMERSAREA MUȘCHILOR ÎN SOLUȚII DE FOSFAȚI ȘI CREATINĂ*

CORNELIU MEDEȘAN

612.816

Rezumat. — Nivelul fosfocreatinei musculare scade apreciabil la mușchii gastrocnemieni de broască izolați, în repaus sau excitați, după 1 sau 4 ore de păstrare în soluții fiziologice aerate, de diferite compoziții. Oxigenarea soluțiilor favorizează sinteza fosfocreatinei. Administrarea de fosfat sau de creatină + fosfat, precum și adăugarea acestora la soluția în care se imersează mușchii, nu determină vreo modificare a nivelului fosfocreatinei.

Literatura ultimilor 30 de ani cuprinde cîteva indicații referitoare la posibilitatea mușchiului de a sintetiza fosfocreatina pornindu-se de la componentele constituente administrate parenteral sau dizolvate în soluțiile în care se imersează mușchiul izolat.

Astfel, Eggleton și Eggleton [1] au arătat că mușchiul gastrocnemian de broască tetanizat resintetizează fosfocreatina, dar numai în prezența oxigenului. Nachmansohn [2] și Meyerhof și Nachmansohn [3] confirmă observațiile anterioare, precizînd că, în mușchiul ținut în soluții Ringer oxigenate, sinteza de fosfocreatină este mai accentuată în prezența fosfaților; în același timp sinteza poate avea loc parțial și în anaerobioză. Meyerhof și Lohmann [4] și Martino [5] consideră că adăugarea creatinei la extractele musculare în mediu alcalin favorizează resinteza fosfocreatinei.

Trebuie să mai menționăm de asemenea cercetările lui Bordi [6], care arată că, introducînd un mușchi tetanizat într-o soluție Ringer cu fosfați, cronaxia scade pe jumătate în comparație cu aceea a mușchiului ținut într-o soluție Ringer fără fosfați. Mușchiul tetanizat introdus într-o soluție Ringer care conține fosfați și creatină prezintă o scădere mai accentuată a cronaxiei. Pe baza acestor rezultate, autorul presupune că scăderea cronaxiei s-ar datora resintezei fosfocreatinei.

Alți cercetători arată că administrarea orală sau parenterală de fosfați înaintea efectuării unui efort fizic mărește randamentul organismului, fie prin intensificarea proceselor de fosforilare a glucozei în mușchi [7], fie datorită stimulării sistemului nervos central [8]. Recent, Markiewicz și Rogozkin [9], lucrînd pe mușchi de șobolani cărora li s-a administrat

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, 3 (1964), în limba franceză.

intraperitoneal o soluţie de NaH_2PO_4, constată că după două ore fosfocreatina creşte cu 58% faţă de normal; acest efect se menţine şi după şase ore, nivelul fosfocreatinei fiind cu 36% mai ridicat decît la animalele-martor. Creşterea glicogenului în acest interval este numai de 18%, iar nivelul acidului lactic rămîne practic neschimbat.

Dat fiind că recent au fost descrise noi metode de dozare a fosfocreatinei, am revenit asupra acestei probleme, aplicînd una din ele, şi anume metoda Alekseeva [10], care permite compararea mai bună a rezultatelor obţinute prin dozarea fosforului cu rezultatele noastre de determinare a creatininei.

În sfîrşit, acest fel de probleme prezintă interes şi datorită faptului că în cercetările de biochimie musculară se practică adesea introducerea muşchilor izolaţi în soluţii saline de compoziţii diferite, fără a se cunoaşte modul în care acestea afectează nivelul fosfocreatinei.

Cu ajutorul metodei Alekseeva s-au urmărit variaţiile fosfocreatinei din muşchi izolaţi de broască menţinuţi în diferite soluţii fiziologice aerate sau oxigenate, precum şi din muşchi de broaşte cărora li s-au administrat soluţii de fosfaţi sau creatină + fosfaţi.

MATERIAL ŞI METODE

Cercetările au fost efectuate, într-o primă serie de experienţe, pe muşchi gastrocnemieni izolaţi de broască (*Rana ridibunda*) normali şi tetanizaţi, ţinuţi în diferite soluţii fiziologice ce conţineau componentele fosfocreatinei, în care se barbota fie un curent de aer, fie unul de carbogen (oxigen 95% şi bioxid de carbon 5%), şi în a doua serie de experienţe pe muşchi în repaus sau excitaţi electric *in situ*, proveniţi de la broaşte cărora li s-au administrat soluţii de fosfaţi sau de fosfaţi + creatină.

În prima serie de experienţe, după secţionarea rapidă a picioarelor posterioare, se izolau rapid muşchii gastrocnemieni (în maximum 20 s). Unul din muşchi, martorul, era îngheţat imediat în azot lichid, dozîndu-se apoi fosfocreatina cu ajutorul metodei Alekseeva [10], procedeu descris pe larg într-o lucrare anterioară [11]. Celălalt muşchi se introducea într-un pahar Berzelius de 10 ml cu soluţie fiziologică; experienţele s-au efectuat la temperatura camerei (20–24°C). Compoziţia salină a soluţiilor fiziologice folosite a fost următoarea:

— pentru soluţia Ringer-Camis [12] fără fosfaţi: NaCl 6,3‰, KCl 0,25 g‰, $CaCl_2$ 0,25 g‰, $NaHCO_3$ 0,15 g‰;

— pentru soluţia Ringer-Camis cu fosfaţi [6]: 9,5 părţi dintr-o soluţie m/15 Na_2HPO_4 + + 0,5 părţi soluţie m/15 KH_2PO_4 se aduc cu soluţie Ringer-Camis fără fosfaţi la 100 ml; fosfatul de calciu precipitat este îndepărtat prin filtrare;

— pentru soluţia Ringer-Camis cu fosfaţi şi creatină [6]: 5 părţi soluţie de creatină m/15 + 5 părţi soluţie tampon de fosfaţi (ca mai sus) se aduc la 100 ml cu soluţie Ringer-Camis fără fosfaţi;

— pentru soluţia Ringer-Jendrassik [13] fără fosfaţi: NaCl 6,5 g‰, KCl 0,2 g‰, $CaCl_2$ 0,2 g‰, $CaCl_2$, 0,2 g‰, $NaHCO_3$ 0,1 g‰; în cazul cînd la soluţia Ringer-Jendrassik se adaugă fosfaţi, se procedează astfel: se amestecă 70 ml Na_2HPO_4 m/15 cu 30 ml NaH_2PO_4 m/15 şi se diluează la un litru cu o soluţie Ringer-Jendrassik fără fosfaţi;

— pentru soluţia Ringer cu fosfaţi dată de Carlson [14]: NaCl 115 mM, KCl 4,8 mM, $CaCl_2$, 1,81 mM, Na_2HPO_4 1,25 mM, NaH_2PO_4 5,00 mM;

— pentru soluția lui Boyle și Conway fără fosfați (soluție Ringer-bicarbonat) [15], [16]: NaCl 95 mM, KCl 2,5 mM, $CaCl_2$ 1,0 mM, $MgSO_4$ 1 mM, $NaHCO_3$ 20 mM.

După un interval de 1 sau 4 ore de la introducerea mușchiului în lichidul fiziologic, acesta se scotea rapid, se îndepărta lichidul aderent prin presare ușoară pe hîrtie de filtru, se îngheța în azot lichid, după care se determina fosfocreatina cu ajutorul metodei Alekseeva.

În variantele experimentale în care mușchiul era tetanizat înaintea introducerii sale în soluții fiziologice, se folosea un generator de impulsuri „Sevotest Orion Type 1925", care furniza un curent de 2,5 V, cu o frecvență de 2 c/s; durata de excitare era de 5 min.

În a doua serie de experiențe s-a administrat la broaște, în sacii dorsali limfatici, cîte 1 ml dintr-o soluție de NaH_2PO_4 sau Na_3PO_4, în doze echivalente cu 30 mg P/kg corp, precum și 60 mg P/kg corp. Creatina se utiliza în cantitate de 0,3 g/kg corp. Loturile-martor primeau NaCl $7^0/_{00}$ în volume echivalente celor de fosfat. Precizăm că concentrația de fosfat de 30 mg P/kg corp a fost utilizată în experiențe pe șobolani de către Markiewicz și Rogozkin [9].

După un interval de 15 min, 1, 2 respectiv 3 ore, se secționau picioarele, se înghețau în azot lichid și se determina fosfocreatina din mușchii înghețați, cu ajutorul metodei Alekseeva.

Într-o altă variantă experimentală, înaintea administrării soluțiilor, mușchii era excitați *in situ*, cu aceeași intensitate de curent, după tehnica descrisă de Macovschi, Iordache și Dragomirescu. S-au folosit două tipuri de excitații, și anume: un curent de 4 mA, 2 impulsuri/s, cu durata de 10 ms și pauză de 490 ms, respectiv un curent de 4 mA, 10 impulsuri/s, cu durată de 10 ms și pauză de 90 ms. După 10 min. de excitare se secționau picioarele posterioare, se înghețau în azot lichid, după care se doza fosfocreatina.

În toate seriile de experiențe, rezultatele au fost exprimate în creatinină dozată și fosfocreatină calculată. Datele cuprinse în tabele reprezintă pentru fiecare variantă, media a 8 determinări.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Rezultatele obținute în cadrul primei serii de experiențe arată că mușchii izolați ținuți 1 oră, respectiv 4 ore în diferite soluții fiziologice aerate, prezintă o scădere a fosfocreatinei în funcție de soluția folosită. Astfel, după cum se remarcă din tabela 1, fosfocreatina scade în medie cu 36% la mușchii ținuți timp de 1 oră în soluție Ringer-bicarbonat (pH8), iar după 4 ore cu 65% față de mușchii simetrici care au fost înghețați imediat. În cazul celorlalte soluții fiziologice, după 1 oră fosfocreatina scade cu 15—20% (ex. soluția Ringer-Camis, pH 6,4), iar după 4 ore cu 35%. O scădere mai mică a fosfocreatinei, cu 11, respectiv 17%, se obține în cazul utilizării soluției Carlson (pH 5,6); cînd acestei soluții i se adaugă glucoză $5^0/_{00}$, nu se constată diferențe (tabela nr. 1).

În varianta experimentală în care mușchii sînt supuși unor excitații electrice înainte de a fi introduși în soluții fiziologice, se constată o scădere mai accentuată a fosfocreatinei, și anume cu 67—74% față de martorii neexcitați (tabela nr. 2).

Examinînd tabela nr. 2, se observă că, indiferent de soluția fiziologică utilizată, nivelul fosfocreatinei rămîne scăzut.

Tabela nr. 1

Valorile medii* ale fosfocreatinei din muşchii gastrocnemieni de la broaşte în repaus. Soluţiile fiziologice au fost aerate prin barbotare de aer

Nr. crt.	MUŞCHI STÎNG îngheţat imediat		MUŞCHI DREPT introdus 1 oră şi 4 ore în soluţie fiziologică, apoi îngheţat				$\Delta = a - b$
	Creatinină a = mg/g muşchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g muşchi (calc.)	Durata imersării muşchiului (ore)	Soluţia fiziologică utilizată	Creatinină b = mg/g muşchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g muşchi (calc.)	
1	1,95	3,63	1	Ringer-Camis	1,67	3,13	0,28
	2,03	3,79	4		1,31	2,45	0,72
2	2,05	3,83	1	Ringer-Camis cu fosfaţi	1,78	3,33	0,27
	1,98	3,70	4		1,25	2,34	0,73
3	2,36	4,41	1	Ringer-Camis cu fosfaţi	1,84	3,44	0,52
	2,40	4,47	4	şi creatină	1,65	3,08	0,75
4	2,22	4,13	1	Ringer-Jendrassik	1,78	3,32	0,44
	2,26	4,21	4		1,69	3,17	0,57
5	1,94	3,62	1	Ringer-Jendrassik cu	1,50	2,80	0,44
	1,97	3,68	4	fosfaţi	1,28	2,40	0,69
6	2,17	4,06	1	Ringer-Jendrassik cu	1,86	3,47	0,31
	2,35	4,40	4	fosfaţi şi creatină	1,58	3,04	0,77
7	2,30	4,29	1	Carlson	2,03	3,80	0,27
	2,56	4,79	4		2,13	3,99	0,43
8	1,95	3,64	1	Carlson cu creatină	1,60	3,00	0,35
	1,96	3,66	4		1,51	2,73	0,45
9	2,04	3,82	1	Carlson cu glucoză 5 ‰	1,97	3,68	0,07
	1,98	3,71	4		1,84	3,44	0,14
10	2,52	4,70	1	Ringer — bicarbonat	1,63	3,04	0,88
	2,39	4,46	4		0,85	1,58	1,54

* Datele reprezintă media a cîte 8 determinări.

Aceste rezultate ne permit să tragem concluzia că muşchii normali sau excitaţi, introduşi pentru 1, respectiv 4 ore în diferite soluţii fiziologice aerate care conţin fosfaţi sau creatină + fosfaţi, nu resintetizează fosfocreatina pe seama acestor componente.

În variantele experimentale în care muşchii izolaţi erau trataţi în aceleaşi condiţii, cu deosebirea că aerarea era înlocuită prin oxigenare, se obţin rezultate diferite. Astfel, din tabela nr. 3 se constată că nivelul fosfocreatinei rămîne practic neschimbat, cu excepţia soluţiei Ringer-bicarbonat, la care se observă o scădere a fosfocreatinei cu 32—36% faţă de muşchiul-martor (tabela nr. 3).

Deci oxigenarea soluţiilor fiziologice impiedică scindarea fosfocreatinei, iar prezenţa fosfaţilor şi a creatinei în soluţii nu influenţează nivelul acesteia.

Tabela nr. 2

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni izolați, supuși excitațiilor directe, fără exercitare de efort mecanic. Curentul folosit este de 2,5 V, 2 c/s, timp de 5 min. Soluțiile fiziologice au fost aerate prin barbotare de aer

Nr. crt.	MUȘCHI STÎNG neexcitat, îngheţat imediat		MUȘCHI DREPT excitat electric, apoi introdus 1 oră sau 4 ore în soluţie fiziologică, apoi îngheţat				$\Delta = a - b$
	Creatinină a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	Durata imersării mușchiului (ore)	Soluția fiziologică utilizată	Creatinină b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	
1	2,32	4,33	1	Ringer-Camis	0,77	1,44	1,55
	2,23	4,18	4		0,72	1,34	1,51
2	1,98	3,70	1	Ringer-Camis cu fosfaţi	0,58	1,09	1,40
	2,03	3,79	4		0.54	1,01	1,49
3	2,05	3,84	1	Ringer-Camis cu fosfaţi	0,58	1,08	1,47
	2,18	4,08	4	şi creatină	0,62	1,17	1,56
4	1,85	3,46	1	Ringer-Jendrassik	0,70	1,31	1,15
	1,85	3,46	4		0,68	1,28	1,17
5	2,01	3,76	1	Ringer-Jendrassik cu	0,61	1,14	1,40
	1,97	3,68	4	fosfaţi	0,57	1,08	1,40
6	2,07	3,87	1	Ringer-Jendrassik cu fos-	0,59	1,10	1,48
	2,01	3,76	4	faţi şi creatină	0,58	1,07	1,43
7	2,13	3,97	1	Carlson	0,63	1,18	1,40
	2,17	4,06	4		0,67	1,25	1,50
8	2,47	4,61	1	Carlson cu creatină	0,89	1,66	1,58
	2,67	4,99	4		0,79	1,47	1,88
9	2,26	4,23	1	Carlson cu glucoză 50‰	0,92	1,73	1,34
	2,11	3,06	4		0,76	1,41	1,35
10	2,30	4,29	1	Ringer-bicarbonat	0,60	1,13	1,70
	2,32	4,34	4		0,63	0,17	1,69

* Datele reprezintă media a cîte 8 determinări.

La mușchii excitați electric și introduși apoi în soluții fiziologice oxigenate, nivelul fosfocreatinei este mai scăzut decît la mușchii neexcitați; acest nivel este totuși mult crescut față de variantele similare în care s-a folosit aerarea. Astfel, din tabela nr. 4 se observă că nivelul fosfocreatinei scade în medie cu 28—48% la toate variantele, în afară de cea în care s-a folosit soluție Ringer-bicarbonat, unde scăderea este de 56, respectiv 63% față de mușchiul-martor. Nici în acest caz sinteza fosfocreatinei musculare nu este favorizată de prezența în soluții a fosfaților și creatinei (tabela nr. 4).

Analizînd rezultatele obținute în cadrul celei de-a doua serii de experiențe (tabela nr. 5), se constată că nivelul fosfocreatinei nu diferă la

Tabela nr. 3

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de la broaște în repaus. Soluțiile fiziologice au fost oxigenate prin barbotare cu carbogen (95% oxigen și 5% bioxid de carbon)

Nr. crt.	MUȘCHI STÎNG înghețat imediat		MUȘCHI DREPT introdus 1 oră sau 4 ore în soluție fiziologică, apoi înghețat				$\Delta = a - b$
	Creatinină a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	Durata imersării mușchiului (ore)	Soluția fiziologică utilizată	Creatinină b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	
1	2,36	4,41	1	Ringer-Camis	2,16	4,03	0,20
	2,24	4,18	4		2,15	4,02	0,09
2	2,30	4,30	1	Ringer-Camis cu fosfați	2,11	3,94	0,19
	2,45	4,57	4		2,46	4,59	0,01
3	2,43	4,54	1	Ringer-Camis + fosfați + creatină	2,48	4,63	0,05
	2,22	4,15	4		2,24	4,19	0,02
4	1,99	3,72	1	Ringer-Jendrassik	2,10	3,93	0,11
	2,03	3,80	4		1,99	3,72	0,04
5	2,16	4,03	1	Ringer-Jendrassik cu fosfați	2,04	3,81	0,12
	2,23	4,25	4		2,18	4,08	0,05
6	2,28	4,26	1	Ringer-Jendrassik + fosfați + creatină	2,38	4,45	0,10
	2,12	3,96	4		2,04	3,82	0,08
7	2,10	3,93	1	Carlson	2,23	4,16	0,13
	1,96	3,67	4		2,14	3,99	0,18
8	2,34	4,37	1	Carlson + creatină	2,29	4,29	0,05
	2,26	4,22	4		2,17	4,05	0,09
9	2,18	4,07	1	Carlson + glucoză $5^0/_{00}$	2,24	4,18	0,06
	2,23	4,17	4		2,18	4,08	0,05
10	2,38	4,45	1	Ringer bicarbonat	1,63	3,05	0,75
	2,31	4,33	4		1,48	2,76	0,83

* Datele reprezintă media a cîte 8 determinări.

loturile tratate față de loturile-martor nici în cazul administrării de fosfat în doză de 60 mg P/kg corp sau fosfat și creatină. De asemenea nu se constată diferențe între loturi nici în cazul cînd înaintea administrării de fosfați mușchii erau excitați *in situ* (tabela nr. 6).

Rezultatele noastre nu concordă cu afirmațiile lui Meyerhof și Nachmansohn [3], care susțin că introducerea unui mușchi într-o soluție de fosfat duce la creșterea conținutului în fosfocreatină. După părerea noastră, datele expuse în tabela X [3] nu justifică această concluzie, deoarece creșterea fosfocreatinei semnalată de autori nu este semnificativă.

De asemenea rezultatele noastre nu confirmă ipoteza lui Bordi [6], după care scăderea cronaxiei mușchilor gastrocnemieni de broască introduși în soluții de fosfați și creatină s-ar datora resintezei fosfocreatinei din componente.

Tabela nr. 4

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni izolați, supuși excitațiilor directe, fără exercitare de efort mecanic. Curentul folosit este de 2,5 V,2 c/s, timp de 5 min. Soluțiile fiziologice au fost oxigenate prin barbotare de carbogen (95% oxigen și 5% bioxid de carbon)

Nr. crt.	MUȘCHI STÎNG neexcitat, înghețat imediat		MUȘCHI DREPT excitat electric, apoi introdus 1 oră sau 4 ore în soluție fiziologică, apoi înghețat				$\Delta = a - b$
	Creatinină a = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calcul.)	Durata imersării mușchiului (ore)	Soluția fiziologică utilizată	Creatinină b = mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	
1	2,33	4,35	1	Ringer-Camis	1,09	2,05	1,24
	2,43	4,54	4		1,27	2,37	1,16
2	2,60	4,86	1	Ringer-Camis cu fosfați	1,34	2,50	1,26
	2,27	4,25	4		1,23	2,29	1,04
3	2,30	4,30	1	Ringer-Camis + fosfați	1,30	2,43	1,00
	2,43	4,54	4	+ creatină	1,42	2,65	1,01
4	2,18	4,07	1	Ringer-Jendrassik	1,58	2,96	0,60
	2,26	4,23	4		1,53	2,86	0,73
5	2,35	4,40	1	Ringer-Jendrassik cu fos-	1,25	2,33	1,10
	2,30	4,29	4	fați	1,14	2,14	1,16
6	2,12	3,96	1	Ringer-Jendrassik + fos-	1,17	2,18	0,95
	2,50	4,68	4	fați + creatină	1,41	2,63	1,09
7	2,31	4,33	1	Carlson	1,53	2,87	0,78
	2,47	4,61	4		1,60	3,00	0,87
8	2,05	3,92	1	Carlson + creatină	1,22	2,28	0,83
	2,15	3,92	4		1,30	2,43	0,85
9	2,28	4,25	1	Carlson + glucoză 5‰	1,18	2,12	1,10
	2,25	4,20	4		1,18	2,21	1,07
10	2,17	4,06	1	Ringer bicarbonat	0,97	1,82	1,20
	2,24	4,18	4		0,84	1,57	1,40

* Datele reprezintă media a cîte 8 determinări.

În sfîrșit, menționăm că datele noastre obținute în cazul administrării de soluții de fosfați sau fosfați și creatină sînt diferite de cele ale lui Markiewicz și Rogozkin [9], diferențe care s-ar putea datora faptului că acești autori au lucrat în alte condiții experimentale, și anume pe mușchi de șobolani.

Datele obținute în lucrarea prezentă ne permit să presupunem că, cel puțin în cazul mușchilor gastrocnemieni de broască, nivelul fosfocreatinei nu este influențat prin aport exogen de componente. Biosinteza fosfocreatinei poate fi într-o oarecare măsură intensificată prin oxigenarea soluțiilor fiziologice în care se imersează mușchii.

Tabela nr. 5

Valorile medii* ale fosfocreatinei din mușchii unor broaște injectate în sacii limfatici dorsali cu soluții de fosfați și creatină

PROBĂ (broaște injectate cu substanță)						MARTOR (broaște injectate cu ClNa 7‰)					
Nr. crt.	Substanța injectată și doza	MUȘCHI STÎNG		MUȘCHI DREPT		Nr. crt.	MUȘCHI STÎNG		MUȘCHI DREPT		Timpul de la administrare (ore)
		Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)		Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	
1	$NaPO_4H_2$	1,81	3,39	1,81	3,39	1	1,79	3,34	1,74	3,24	1
2	30 mg P/	1,78	3,32	1,81	3,39	2	1,82	3,39	1,77	3,30	1
3	kilocorp	1,82	3,39	1,84	3,43	3	1,74	3,24	1,82	3,39	3
4	$NaPO_4H_2$	1,71	3,19	1,71	3,19	4	1,70	3,17	1,70	3,17	1
5	60 mg P/ kilocorp										
6	$NaPO_4H_2$ 30 mg P/ kilocorp + creatină	1,74	3,24	1,73	3,23	5	1,69	3,15	1,17	3,30	2
		1,74	3,24	1,74	3,24	6	1,68	3,13	1,68	3,13	2

* Datele reprezintă media a cîte 6 determinări.

Tabela nr. 6

Valorile medii * ale fosfocreatinei din mușchii gastrocnemieni de la broaște, supuși excitațiilor directe, fără exercitare de efort mecanic, și apoi injectați cu o soluție de $NaPO_4H_2$ 30 mg P kilocorp

PROBĂ (broaște injectate cu substanță)						MARTOR (broaște injectate cu Cl Na 7‰)					
Nr. crt.	Curentul folosit	MUȘCHI STÎNG		MUȘCHI DREPT		Nr. crt.	MUȘCHI STÎNG		MUȘCHI DREPT		Timpul de la administrare
		Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)		Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	Creatinină mg/g mușchi (determ.)	Fosfocreatină mg/g mușchi (calc.)	
1	4 mA,	1,92	3,58	1,86	3,47	1	1,88	3,51	1,75	3,26	1-2 ore
2	2 imp./s	1,76	3,28	1,74	3,24	2	1,87	3,49	1,89	3,52	1 oră
3	10 ms. durata unui impuls,	1,94	3,62	1,93	3,60	3	1,98	3,69	2,14	3,99	1 oră
4	490 ms pauză	1,96	3,65	1,90	3,54	4	2,01	3,75	1,96	3,65	1 oră
5	4 mA,	1,74	3,24	1,66	3,09	5	1,69	3,15	1,72	3,21	1 oră
6	10 imp./s,	1,56	2,91	1,52	2,83	6	1,55	2,89	1,55	2,89	15 min
7	10 ms durata unui impuls,	0,42	0,78	0,56	1,04	7	0,47	0,87	0,57	1,06	0 min
8	90 ms pauză	1,63	3,04	1,61	3,00	8	1,68	3,13	1,64	3,06	15 min

* Datele reprezintă media a cîte 6 determinări.

CONCLUZII

Mușchii gastrocnemieni de broască, izolați și aflați în stare de repaus, introduși fiind pentru 1 oră sau 4 ore în soluții fiziologice de diferite compoziții aerate, prezintă o scădere importantă a fosfocreatinei musculare.

S-a stabilit că oxigenarea soluțiilor fiziologice în care s-au introdus mușchii în repaus sau excitați creează condiții favorabile pentru sinteza fosfocreatinei.

Adăugarea componentelor fosfocreatinei (fosfat sau creatină + fosfat) în soluțiile fiziologice în care se imersează mușchii, precum și injectarea unor broaște în sacii dorsali limfatici cu aceste componente, nu determină creșterea fosfocreatinei musculare.

Prezentată la redacție
la 25 iunie 1964

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

BIBLIOGRAFIE

1. P. EGGLETON, G. P. EGGLETON, *Further observations on phosphagen*, Biochem. J., **XXI**, *1*, 190 (1927).
2. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels. II*, Biochem. Z., **208**, 237 (1929).
3. O. MEYERHOF, D. NACHMANSOHN, *Über die Synthese der Kreatinphosphorsäure im lebenden Muskel*, Biochem. Z., **222**, 1 (1930).
4. O. MEYERHOF, K. LOHMANN, *Über die natürlichen Guanidinophosphorsäuren (Phosphagene) in der quergestreiften Muskulatur*, Biochem. Z., **196**, 22 (1928).
5. G. MARTINO, *The behaviour of phosphagen in muscular tetany*, C. A., **24**, 405 (1930).
6. P. BORDI, *Scissione e resintesi del fosfageno e cronassia*, L'Ateneo Parmense, seria a II-a, **XXVI**, *1*, 755 (1933).
7. G. EMBDEN, E. GRAFE, E. SCHMITZ, *Über Steigerung der Leistungsfähigkeit durch Phosphatzufuhr*, Ztschr. physiol. Chem., **113**, 67 (1921).
8. A. A. DANILOV, A. F. KOREAKINA, E. B. KASOVSKAIA, A. N. KRESTOVNIKOV, A. W. FOMICZEV, Zurn. Exp. Biol. Med., ser A, **13**, 92 (1930).
9. L. MARKIEWICZ, W. A. ROGOZKIN, *Behaviour of phosphocreatine, glicogen and lactic acid in muscles after sodium phosphate administration*, Bull. Acad. Pol. Sci., serie Sci. biol., **VII**, *9*, 341 (1959).
10. A. M. ALEKSEEVA, *K voprosu o prevrașcenii kreatinfosfata v kreatinin i o novom metode opredeleniia kratinfosfata*, Biochimiia, **16**, *2*, 97 (1951).
11. C. MEDESAN, *Compararea unor metode de dozare a fosfocreatinei musculare în diferite condiții experimentale*, St. cerc. Biochim., **7**, *1*, 67 (1964).
12. M. CAMIS, *Physiological and histological observations on muscles, chiefly in relation to the action of guanidine*. J. Physiol., **39**, 73 (1909).
13. L. JENDRASSIK, J. FAISZT, *Die ersten chemischen Prozesse der Muskelkontraktion*, Ann. Sci. Univ. Budapest, Rolando Eötvös nom., sect. Biol., **1**, 133 (1957).
14. R. D. CARLSON, A. SIGER, *The mechanochemistry of muscular contraction. I. The isotonic twich*, J. Gen. Physiol., **44**, 33 (1960).
15. P. J. BOYLE, E. J. CONWAY, *Potassium accumulation in muscle and associated changes*. J. Physiol., **100**, 1 (1941).
16. W. F. MOMMAERTS, K. SERAYDARIAN, G. MARÉCHAL, *Work and chemical change in isotonic muscular contractions*, Biochim. Biophys. Acta, **57**, 12 (1962).
17. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Nivelul fosfagenului în diferite stări funcționale ale mușchiului*, St. cerc. Biochim., **5**, *2*, 207 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 385 – 392 (1964)

ACȚIUNEA EXCITAȚIILOR ELECTRICE ASUPRA NIVELULUI COMPUȘILOR ADENOZINFOSFORICI DIN MUȘCHI *

NATALIA MOLDOVEANU

612.821.33

Rezumat. — S-a urmărit variația nivelului acizilor adenozinfosforici din mușchii gastrocnemieni de broască excitați electric direct (*in situ*), fără travaliu și în travaliu. Prin folosirea cromatografiei schimbătoare de ioni și cu unele modificări aduse sistemului de eluare, s-a realizat în 4 ore o separare bună a fosfonucleotidelor adenilice. După excitațiile electrice de scurtă durată (30 s), nivelul ATP, ADP și AMP se menține constant. Excitarea timp de 15 min, fără travaliu, duce la o scădere a ATP, urmată de o creștere a ADP, iar în excitarea cu travaliu descompunerea ATP și creșterea ADP sînt mai marcante. Nivelul AMP se menține constant. La excitarea timp de peste 15 min (20—30 min) s-a constatat o tendință de plafonare a nivelului ATP și ADP din mușchi.

Pentru stabilirea rolului substanțelor macroergice în contracția musculară, în ultimii 30 de ani s-au făcut numeroase cercetări, atenția principală fiind acordată ATP**, a cărui scindare furnizează energia de contracție, și CP ***, care reface ATP consumat. Cu toate acestea, în ultimul timp Fleckenstein și colab. [1], Lîzlova [2], Mommaerts [3], Dixon și Sacs [4] și alții [5], [6] nu au putut observa scindarea ATP și CP din mușchiul izolat care a efectuat cîteva contracții singulare sau tetanizări de scurtă durată.

Pentru a preciza care este primul donator de energie de contracție, s-au făcut recent cercetări prin blocarea diferitelor sisteme enzimatice. Astfel, Carlson și Sieger [7] și Mommaerts și colab. [8], blocînd cu iodacetat glicoliza din mușchi, deci posibilitatea refacerii ATP pe această cale, au constatat în cazul contracțiilor singulare că nivelul ATP rămîne constant, iar al CP scade. După scăderea pînă la un anumit nivel a CP începe să scadă și ATP. Chain și Davies [9], inhibînd cu *1*-fluoro-*2*,*4*-dinitrobenzen ATP-creatin-fosforiltransferaza (enzima lui Lohmann), deci posibilitatea refacerii imediate a ATP din CP, au observat în urma contrac-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, *3* (1964), în limba franceză.

** ATP = acid adenozin-trifosforic; ADP = acid adenozin-difosforic; AMP = acid adenozin-monofosforic; IMP = acid inozin-monofosforic.

*** CP = creatin-fosfat.

țiilor singulare că, în timp ce CP se menține la un nivel constant, ATP se descompune. Aceste cercetări au demonstrat că ATP este sursa imediată a energiei de contracție, în timp ce CP reface ATP consumat.

Cu toate că în jurul acestei probleme s-au făcut multiple cercetări, au mai rămas o serie de aspecte nelămurite, avînd în vedere complexitatea reacțiilor care au loc.

În lucrarea de față, ne-am propus să cercetăm unul dintre aceste aspecte, și anume variația nivelului acizilor adenozinfosforici din mușchi în urma excitării electrice și a efectuării unui travaliu, față de nivelul acestora din mușchii excitați liber. Totodată, spre deosebire de majoritatea cercetărilor care au fost făcute pe mușchi izolat, în lucrarea de față s-a lucrat în condițiile organismului întreg, cu metoda introdusă de Macovschi, Iordache și Dragomirescu [10].

MATERIAL ȘI METODE

S-a lucrat pe mușchi gastrocnemieni de broască, excitați electric direct, *in situ* [10], timp de 30/s, 15, 20 și 30 min., cu generatorul de impulsuri Polystat (intensitatea de 1 mA, frecvența de 5 imp./s și durata impulsului de 10 m/s), cu următoarele variante experimentale :

1. Unul dintre mușchi a fost excitat liber, iar celălalt a rămas în repaus.
2. Unul dintre mușchi a fost excitat și supus efectuării unui travaliu (prin atîrnarea de piciorul excitat a unei greutăți de 100 g), iar celălalt a rămas în repaus.
3. Unul dintre mușchi a fost excitat și supus efectuării unui travaliu, iar celălalt a fost excitat liber (fără travaliu).

Imediat după terminarea excitațiilor, s-au retezat picioarele broaștelor, lăsîndu-se să cadă în azot lichid. Mușchii înghețați au fost izolați și mojarați în azot lichid, iar praful obținut s-a trecut în eprubete de centrifugă, tarate și răcite în zăpadă carbonică. Eprubetele cu praful de mușchi înghețat au fost cîntărite imediat și ținute în continuare în zăpadă carbonică. Toate operațiile care au urmat pînă la obținerea extractului final s-au făcut la 0 °C, după indicațiile din literatură [9], [12], după cum urmează :

Acizii adenozinfosforici s-au extras prin omogenizarea timp de 3 min (în aceleași eprubete) cu cîte 2 volume acid percloric 0,6 M. Omogenatele musculare s-au centrifugat timp de 15 min la 5 000 t/min. Supernatantele s-au neutralizat cu KOH 5 M și 0,5 M (în prezență de roșu de fenol), excesul de acid percloric precipitînd astfel sub formă de perclorat de potasiu. Sedimentele de mușchi s-au reextras cu cîte 2 volume de acid percloric 0,2 M. Supernatantele au fost unite, neutralizate ca mai sus, înghețate și păstrate la —12 °C timp de 1—6 zile. Înainte de folosire, probele s-au dezghețat și s-au centrifugat la 0 °C pentru îndepărtarea percloratului de potasiu.

Pentru dozarea ATP, ADP și AMP s-a folosit metoda cromatografiei pe rășini schimbătoare de ioni, dată de Cohn și Carter [11], modificată de Hurlbert și colab. [12] și de De Luca și colab. [13], iar pentru a obține o separare distinctă și într-un timp mai scurt a componentelor în lucrarea de față s-au adus unele modificări sistemului de eluare. Dăm mai jos condițiile exacte în care s-a lucrat.

S-a folosit rășina Dowex 2 × 8, 200—400 mesh, care a fost transformată în formiat după indicațiile din literatură [12].

S-a lucrat simultan pe patru coloane (cu un diametru de 0,8 cm), înălțimea stratului de rășină fiind de 20 cm. Vasul de amestec (de 750 ml), plasat cu 75 cm deasupra coloanelor, a conținut 450 ml acid formic 1 M. Rezervorul (o pîlnie de separare de 1 000 ml) a avut inițial 550 ml formiat de amoniu 0,5 M (amestec echimolecular de acid formic și hidroxid de amoniu), în acid formic 4 M.

Pentru stabilirea piscurilor și a vitezei de eluție, s-a lucrat inițial cu soluții standard de ATP, ADP și AMP. Sarea de sodiu a ATP a fost transformată în acid prin trecerea pe o coloană Dowex 50 și apoi s-a neutralizat cu KOH (în prezență de roșu de fenol). Eșantioanele de ADP și AMP au fost neutralizate în aceleași condiții. Pe coloană s-au trecut probe standard de 1 μM ATP, 0,5 μM ADP și 0,5 μM AMP.

Probele de analizat, diluate (fiecare probă conținînd extractul a 0,4—0,5 g mușchi), au fost absorbite pe coloane și s-au spălat de trei ori cu cîte 1 ml apă. S-au pus apoi peste rășină cîte 5 ml acid formic 1 M și s-au făcut legăturile coloanelor cu camera de amestec, începîndu-se eluarea compușilor adenozinofosforici absorbiți pe coloane, inițial numai cu acid formic 1 M. S-a lucrat cu un debit de 0,8 ml/min și s-au prins fracțiuni de cîte 4 ml. După colectarea fracțiunii a 7-a, cînd eluția AMP a fost totală, s-a deschis robinetul rezervorului, începîndu-se eluarea gradientă a celorlalți compuși adenozinfosforici. Omogenizarea lichidelor s-a realizat cu un agitator magnetic. La fracțiunea 40, după eluarea ADP, s-a înlocuit conținutul rezervorului cu 550 ml formiat de amoniu 0,8 M în acid formic 4 M, continuîndu-se eluarea gradientă pînă la fracțiunea 70, cînd s-a terminat complet și eluarea ATP. Eluarea tuturor componentelor s-a făcut în 4 ore. Eluatele au fost citite la un spectrofotometru Zeiss tip NSV, la 260 mμ.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

În figura 1 este dat un exemplu de eluție tipică a unei cromatografieri simultane a două extracte provenite de la doi mușchi simetrici în repaus. După cum se vede din figură, prin modificarea adusă s-a realizat o separare distinctă și destul de rapidă a fosfonucleotidelor adenilice și s-a obținut corespondența dintre poziția piscurilor. Citirile spectrofotometrice la 260 mμ ale fracțiunilor eluate au indicat valori apropiate pentru ATP, ADP și AMP din cei doi mușchi.

Dat fiind că valorile obținute în experiențele făcute pe mușchi în repaus au fost concordante între ele, s-a trecut la cercetarea propriu-zisă. În consecință, am urmărit întîi cele trei variante menționate, folosind timpul de excitare de 30 s. Rezultatele obținute prin excitarea directă a mușchiului timp de 30/s, fără travaliu și în travaliu, au arătat că în aceste condiții nu se pot pune în evidență modificări ale conținutului de ATP, ADP și AMP din mușchi.

Mărind mult timpul de excitare, la 15 min, s-a constatat în cazul tuturor variantelor experimentale o scădere a nivelului ATP și o creștere a ADP.

Rezultatele primei variante experimentale, în care unul dintre mușchi a fost excitat liber timp de 15 min, iar celălalt a rămas în repaus, sînt trecute în tabela nr. 1. După cum reiese din tabelă, cantitatea de ATP din mușchiul excitat este mai scăzută (aproximativ cu 1/5) față de aceea din mușchiul în repaus, iar cea de ADP mai ridicată (aproximativ cu 1/2).

Se ajunge în acest fel la scăderea valorii raportului ATP/ADP de la 4,45 la 2,5.

Descompunerea ATP la mușchiul excitat (0,63 μM/g) este mai mare decît creșterea ADP (0,28 μM/g). Valoarea AMP din mușchiul excitat

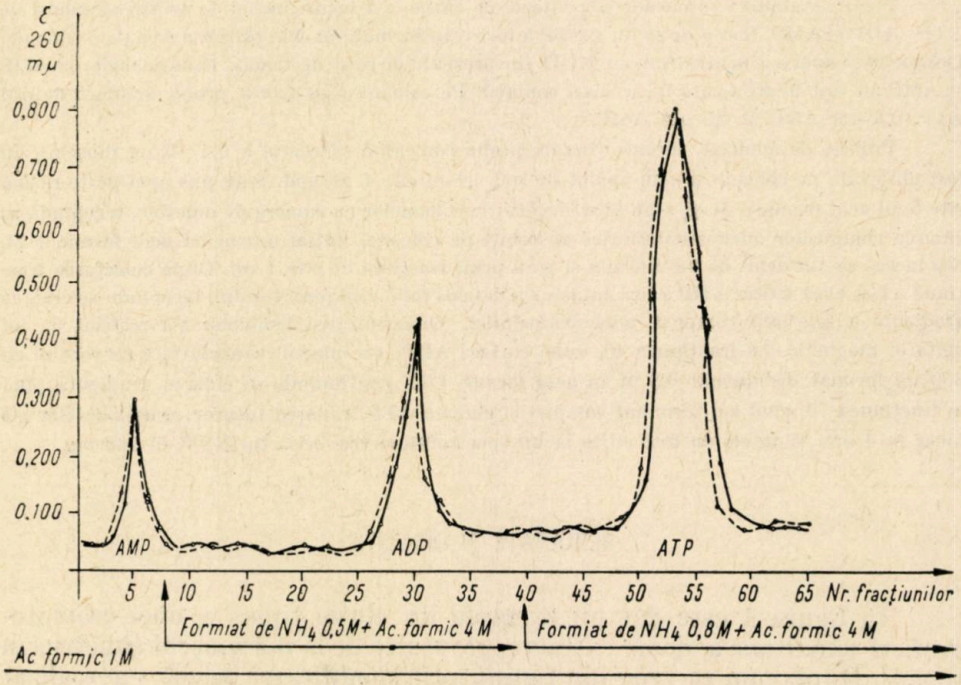


Fig. 1. — Eluția tipică a unei cromatografieri simultane a două extracte de la cei doi mușchi gastrocnemieni simetrici ai unei broaște în repaus.

rămîne apropiată de aceea din mușchiul în repaus (diferența dintre valorile medii fiind de 0,035 μM/g).

La a doua variantă experimentală, în condițiile efectuării de către mușchiul excitat timp de 15 min a unui travaliu, s-a constatat, după cum reiese din tabela nr. 2, că descompunerea ATP este cu mult mai amplă — aproximativ de două ori — decît cea găsită în experiențele efectuate în excitarea fără travaliu. Creșterea nivelului ADP ca rezultat al scindării ATP este de asemenea aproximativ două ori mai mare decît cea redată în tabela nr. 1. În același timp se accentuează și scăderea valorii raportului ATP/ADP, care ajunge de la 4,64 la 1,63. Este necesar să subliniem că și în condițiile efectuării unui travaliu creșterea ADP (0,55 μM/g) este mai mică decît descompunerea ATP (1,37 μM/g). Ca și în tabela nr. 1, valorile AMP rămîn practic apropiate de cele găsite la mușchiul în repaus.

Pentru a evidenția mai bine accentuarea scăderii ATP în excitarea electrică cu travaliu, s-a lucrat a treia variantă experimentală, pe broaște, la care unul dintre mușchi a fost excitat în travaliu, iar celălalt excitat fără

Tabela nr. 1

Variaţia compuşilor adenozinfosforici din muşchiul gastrocnemian de broască excitat electric, fără travaliu, timp de 15 min, faţă de conţinutul acestora din muşchiul în repaus (μ Moli/g muşchi)

Exp. nr.	Muşchi	ATP	Diferenţa	ADP	Diferenţa	AMP	Diferenţa	ATP / ADP
1	Repaus	2,44		0,66		0,40		3,65
			−0,12		+0,53		+0,04	
	Excitat fără travaliu	2,32		1,19		0,44		1,94
2	Repaus	3,41		0,81		0,41		4,20
			−0,70		+0,21		+0,04	
	Excitat fără travaliu	2,71		1,02		0,45		2,63
3	Repaus	3,32		0,88		0,39		3,76
			−0,75		+0,33		+0,05	
	Excitat fără travaliu	2,57		1,21		0,44		2,11
4	Repaus	4,00		0,88		0,34		4,54
			−1,06		+0,64		+0,03	
	Excitat fără travaliu	2,94		1,52		0,37		1,93
5	Repaus	3,19		0,73		0,40		4,34
			−0,51		+0,13		+0,02	
	Excitat fără travaliu	2,68		0,86		0,42		3,12
Medii	Repaus	3,27		0,78		0,39		4,17
			−0,63		+0,28		+0,03	
	Excitat fără travaliu	2,64		1,06		0,42		2,50

Tabela nr. 2

Variaţia compuşilor adenozinfosforici din muşchiul gastrocnemian de broască excitat electric timp de 15 min. în travaliu, faţă de conţinutul acestora din muşchiul în repaus (μ M/g muşchi)

Exp. nr.	Muşchi	ATP	Diferenţa	ADP	Diferenţa	AMP	Diferenţa	ATP / ADP
1	Repaus	3,20		0,73		0,36		4,35
			−1,23		+0,55		+0,08	
	Excitat în travaliu	1,97		1,28		0,44		1,53
2	Repaus	3,95		0,64		0,48		6,19
			−1,49		+0,54		+0,06	
	Excitat în travaliu	2,46		1,18		0,54		2,08
3	Repaus	3,66		0,78		0,33		4,68
			−1,01		+0,63		+0,07	
	Excitat în travaliu	2,65		1,41		0,40		1,88
4	Repaus	3,86		0,84		0,50		3,60
			−2,04		+0,51		−0,01	
	Exc'tat în travaliu	1,82		1,35		0,49		1,34
5	Repaus	2,83		0,80		0,59		3,52
			−0,98		+0,54		+0,03	
	Excitat în travaliu	1,85		1,34		0,62		1,37
Medii	Repaus	3,52		0,76		0,45		4,64
			−1,37		+0,56		+0,05	
	Excitat în travaliu	2,15		1,32		0,50		1,63

travaliu timp de 15 min. Datele obținute, redate în tabela nr. 3, confirmă și în acest caz rezultatele prezentate în tabelele nr. 1 și 2 : are loc o descompunere mai accentuată a ATP, o creștere a ADP, precum și aceeași constanță în concentrația AMP din mușchi care au efectuat un travaliu față de cei excitați fără travaliu.

Tabela nr. 3

Variația compușilor adenozinfosforici din mușchiul gastrocnemian de broască excitat electric direct timp de 15 min în travaliu, față de variația acestora din mușchiul excitat fără travaliu (μM/g mușchi)

Exp. nr.	Mușchi	ATP	Diferența	ADP	Diferența	AMP	Diferența	ATP/ADP
1	Excitat fără travaliu	2,83	−0,09	0,92	+0,20	0,33	−0,08	3,09
	Excitat în travaliu	2,74		1,12		0,41		2,44
2	Excitat fără travaliu	2,88	−0,31	0,71	+0,44	0,38	+0,04	4,03
	Excitat în travaliu	2,57		1,15		0,34		2,23
3	Excitat fără travaliu	1,99	−0,61	0,96	+0,16	0,46	−0,06	2,07
	Excitat în travaliu	1,38		1,12		0,52		1,22
4	Excitat fără travaliu	2,87	−1,13	1,61	+0,64	0,54	−0,01	1,78
	Excitat în travaliu	1,74		2,25		0,55		0,77
5	Excitat fără travaliu	2,15	−0,37	0,97	+0,36	0,39	0,00	2,20
	Excitat în travaliu	1,78		1,33		0,39		1,33
Medii	Excitat fără travaliu	2,94	−0,90	1,03	+0,37	0,42	−0,02	2,84
	Excitat în travaliu	2,04		1,40		0,44		1,46

Prin mărirea timpului de excitare a mușchiului la 20—30 min, în toate condițiile de excitare de mai sus nu s-au obținut alte valori decît cele înregistrate la 15 min. La excitarea prelungită s-a constatat deci o tendință de plafonare a nivelului ATP și ADP din mușchi.

Constatările făcute prin folosirea excitărilor de scurtă durată (30 s), care au arătat că în acest caz nivelul ATP, ADP și AMP nu se modifică, vin în concordanță cu datele din literatură [1—4]. Această constanță a ATP în excitațiile scurte este consecința refacerii ATP din mușchi pe multiplele căi cunoscute :

a) refecerea imediată din CP, prin intermediul ATP-creatin-fosforiltransferazei, conform reacției :

$$ADP + CP \rightarrow ATP + C;$$

b) refacerea din doi moli de ADP, prin intermediul ATP-AMP-transfosforilazei, conform reacției:

$$2\ ADP \rightarrow ATP + AMP;$$

c) refacerea pe cale glicolitică de la nivelul acizilor 1—3 difosfogliceric și fosfoenolpiruvic;

d) refacerea prin fosforilarea oxidativă.

Descompunerea ATP, pusă în evidență prin datele noastre experimentale, în excitarea electrică fără travaliu, și mai ales accentuarea acestei descompuneri în excitarea electrică cu travaliu, se pot explica prin epuizarea rezervei de CP din mușchi, și deci prin imposibilitatea refacerii ATP pe această cale. Descompunerea masivă a CP în timpul excitațiilor prelungite la mușchiul izolat a fost observată de către Nachmansohn [14], Caldwell [15] etc. și de asemenea la mușchiul izolat și *in situ* de Macovschi și colab. [10] și Iordache [16].

Faptul că în excitarea electrică, cu și fără travaliu, creșterea ADP este mai mică decît ar rezulta din descompunerea ATP poate fi atribuită activității ATP-AMP-transfosforilazei, care catalizează reacția:

$$2\ ADP \rightarrow ATP + AMP.$$

Ar urma de aici că AMP ar trebui să fie crescut, ceea ce nu se remarcă însă din datele tabelate. Explicația este că acumularea peste o anumită limită a sa ar duce la intoxicarea mușchiului, ceea ce se evită prin intervenția 5′-adenilatdezaminazei, care catalizează reacția:

$$AMP \rightarrow IMP + NH_3.$$

Constatările făcute de noi în cadrul excitațiilor prelungite (20—30 min), cînd valorile obținute sînt asemănătoare celor de la 15 min, duc la presupunerea că în mușchi există unele mecanisme biochimice care nu permit scăderea ATP sub anumite limite.

CONCLUZII

1. Prin excitarea electrică directă, de scurtă durată (30 s) a mușchilor gastrocnemieni de broască fără travaliu sau în travaliu, nu s-au pus în evidență modificări ale nivelului ATP și ADP din mușchi.

2. Excitarea electrică directă de 15 min duce la scăderea conținutului în ATP, urmată de creșterea celui de ADP din mușchi.

3. Prin excitarea electrică directă de 15 min a mușchiului care efectuează un travaliu, descompunerea ATP și creșterea ADP sînt mai accentuate decît în cazul mușchiului excitat fără travaliu.

4. Excitarea îndelungată (20—30 min) a mușchiului fără travaliu și în travaliu nu mai aduce alte modificări în plus față de cele survenite la 15 min.

5. Nivelul AMP din mușchi rămîne nemodificat, fie că excitarea electrică fără travaliu sau în travaliu este de scurtă durată (30 s), fie că e de lungă durată (15—30 min).

Prezentată la redacție
la 22 iunie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. A. FLECKENSTEIN, J. JANKE, R. E. DAVIES, H. A. KREBS , *Chemistry of muscle contraction. Contraction of muscle without fission of adenosinetriphosphate or creatinephosphate.* Nature, **174**, 1081 (1954).
2. S. N. LÎZLOVA, *Efektivnosti ispolzovania nekotorîh metabolitov dlia professov fosforilirovania v mîştah pri pokoe i vozbujdenie*, Vestn. Leningrad in-ta, Ser. biol. geogr. i geol., *4*, *10*, 105 (1953).
3. W. F. H. M. MOMMAERTS, Investigation of the presumed breakdown of adenosinetriphosphate and phosphocreatine during a single muscle twitch, Amer. J. of Physiol., **182**, 585 (1955).
4. G. J. DIXON, J. SACS, *Occurence of phosphate exchanges in muscular contraction*, Amer. J. of Physiol., **193**, 129 (1958).
5. B. CHANCE, C. M. CONNELLY, *A method for the estimation of the increase in concentration of adenosinediphosphate in muscle sarcosomes following a contraction*, Nature, **179**, 1235 (1957).
6. S. N. LÎZLOVA, N. S. PANTELEEVA, *Ossobenosti fosforno-uglevodnogo obmena skeletnoi mîşti pri razlicinih funkţionalnih sostoianiah*, Ucen. zap. Leningradu, seria biol. nauk, *43*, 222, 297 (1957).
7. R. D. CARLSON, A. SIEGER, *The mecano-chemistry of muscular contraction. I. The isotonic twitch*, J. Ges. Physiol., *44*, 33 (1960).
8. W. F. H. M. MOMMAERTS, K. SERAYDANIAN, G. MARECHAL, *Work and chemical change in isotonic muscular contraction*, Biochimica et Biophys. Acta, **57**, 1 (1962).
9. F. D. CHAIN, R. E. DAVIES , *Breakdown of adenosinetriphosphate during a single contraction of working muscle*, Biochem. and Biophys. Res. Comm., *8*, 361 (1962).
10. E. MACOVSCHI, C. IORDACHE, C. DRAGOMIRESCU, *Fosfagenul în diferite stări de activitate şi excitabilitate musculară*, St. cerc. biochim., **IV**, *2*, 171 (1961).
11. W. E. COHN, C. E. CARTER, *The separation of adenosinepolyphosphates by ion exchange and paper chromatography*, J. Amer. Chem. Soc., **72**, 4273 (1950).
12. B. R. HURLBERT, H. SCHMITZ, F. A. BRUMM, R. VON POTTER, *Nucleotide metabolism. II. Chromatographic separation of acid-soluble nucleotides*, J. Biol. Chem., **209**, 23 (1954).
13. C. DE LUCA, H. J. STEVENSON, E. KAPLAN, *Simultaneous multiplecolumn chromatography; its application to the separation of the adeninenucleotides of human erytrocytes*, Anal. Biochem., *4*, 39 (1962).
14. D. NACHMANSOHN, *Über den Zerfall der Kreatinphosphorsäure im Zusammenhang mit der Tätigkeit des Muskels*, I, Biochem. Z., *196*, 73 (1928).
15. P. C. CALDWELL, *The separation of the phosphate esters of muscle by paper chromatography*, Biochem. J., **55**, 459 (1953).
16. C. IORDACHE, *Rolul excitaţiilor şi efortului mecanic în descompunerea fosfagenului din muşchi în diferite stări de excitabilitate*, St. cerc. biochim., **VII**, *2*, 195 (1964).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 393 – 397 (1964)

MODIFICAREA PROPRIETĂȚILOR ANTIGENICE ALE PROTEINELOR DIN SERUL SANGUIN UMAN ÎN URMA DENATURĂRII TERMICE

I. CERCETĂRI IMUNOELECTROFORETICE ÎN GEL DE AGAROZĂ *

DAN MOȚET

612.124 : 576.8.097

Rezumat. – Antigenitatea proteinelor serice se modifică simțitor chiar în urma unei încălziri la 56 °C timp de 30 min. Astfel, imunoelectroforetic se constată că aceste denaturări nu se rezumă la complement, ci afectează și alte fracțiuni proteice, ducînd la o scădere a liniilor din zonele alfa și beta.

Denaturarea timp de 30 min. la 60 °C duce la o accentuare a modificărilor din zonele alfa- și beta- globulinelor. De asemenea liniile albuminei și gamma-globulinei scad în intensitate.

Datele obținute vin în sprijinul afirmației făcute într-o lucrare anterioară, că noua fracțiune apărută în cadrul procesului de omogenizare electroforetică este o fracțiune antigenică independentă atît de albumine și gamma-globuline, din care provine, cît și de alfa- și beta- globuline, căreia i se suprapune ca mobilitate electroforetică.

Pornind de la constatarea făcută de E. Macovschi și M. Cârsteanu [1], după care cantitatea de coacervat ser-acacia care se formează depinde de temperatura la care a fost menținut înainte serul, am arătat într-o lucrare anterioară [2] că, în urma denaturării termice, comportarea la coacervare a diferitelor fracțiuni proteice din serul sanguin uman se modifică. Prin testul comportării la coacervare am reușit să punem în evidență chiar și denaturări neevidențiabile electroforetic, cum ar fi acelea care rezultă în urma încălzirii serului timp de 30 min. la 56 °C. Pentru a preciza gradul acestor denaturări, care se practică în mod curent în imunologie la inactivarea complementului, am găsit util să urmărim modificarea proprietăților imunologice pe care le suferă diferitele fracțiuni atît în urma acestei denaturări, cît și după o denaturare mai puternică (30 min. la 60 °C).

Modificarea proprietăților antigenice a fost urmărită cu ajutorul serurilor imune de iepure preparate față de serul normal, serul denaturat la 56 °C și serul denaturat la 60 °C. Cu aceste antiseruri s-au efectuat cercetări imunoelectroforetice comparative, pentru a stabili fracțiunile proteice la nivelul cărora se produc modificări în urma termodenaturării.

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 1, 3 (1964), în limba engleză

Pentru precizarea liniilor de precipitare care dispar în urma denaturării, am folosit metoda absorbției cu seruri denaturate a serurilor imune preparate cu ser nativ, urmată de imunoelectroforeza serului nativ, folosind antiserul absorbit.

MATERIAL ȘI METODE

Serul denaturat a fost obținut prin menținerea serului nativ proaspăt timp de 30 min la 56 °C, respectiv 60 °C, în ultratermostatul Höppler. Apoi serul a fost păstrat la frigider, iar a doua zi analizat.

Serurile imune le-am obținut prin hiperimunizarea iepurilor de aproximativ 2,5 kg, după o tehnică asemănătoare cu cea a lui Grabar [3], dar folosind ca adjuvant gelul de hidroxid de aluminiu.

În prima săptămînă am injectat subcutanat un amestec de 0,5 ml ser cu 1,5 ml soluție de NaCl fiziologică și 2 ml gel de hidroxid de aluminiu ; în a doua săptămînă, 1 ml ser cu 1 ml soluție de NaCl fiziologică și 2 ml gel de hidroxid de aluminiu ; în a treia săptămînă, 2 ml ser și 2 ml adjuvant. În săptămînile 4, 5 și 6 am injectat de patru ori pe săptămînă ser diluat (1 parte ser la 8 părți soluție de NaCl fiziologică), fără adjuvant, în următoarele cantități : săptămîna a 4-a cîte 0,5 ml ; săptămîna a 5-a cîte 1 ml și săptămîna a 6-a cîte 2 ml. Sîngerarea am făcut-o la 8–10 zile după ultima injecție.

Imunoelectroforeza a fost efectuată în gelul de agaroză, care permite o separare mult mai bună a numeroaselor arcuri de precipitare pe care le dă serul sanguin, după cum am arătat într-o lucrare efectuată împreună cu V. Gheție [4]. Agaroza a fost preparată după tehnica recomandată de S. Hjertén [5]. Amintim însă că, ulterior, modul de preparare a fost îmbunătățit și simplificat simțitor [6], [7]. Recent, agaroza a devenit un produs comercial furnizat de I.B.F.

Concentrația agarozei în gel a fost de 1,3%. Prepararea plăcilor a fost identică cu cea folosită și în cazul agarului.

Analizele electroforetice s-au efectuat la temperatura camerei, folosindu-se o cădere de potențial de 25 V/cm, timp de 3—4 ore. Intensitatea curentului a fost de 1 mA/cm. Imunoelectroforeza s-a efectuat după tehnica lui J. J. Scheidegger [8]. Am utilizat tamponul veronal-veronal sodic pH 8,6, puterea ionică în cuvă = 0,05, în gel = 0,017.

După aplicarea serului imun, plăcile au fost ținute 48 de ore la temperatura camerei, în cameră umedă, și apoi spălate timp de 72 de ore în soluție fiziologică de NaCl, schimbată în acest interval de patru ori. Plăcile spălate au fost uscate sub hîrtie de filtru și colorate cu amidoschwarz.

Absorbția serului s-a făcut adăugîndu-se la serul imun de iepure antiom ser uman denaturat la 56°C, respectiv 60°C, după care s-a menținut o oră la termostat la 37 °C și apoi s-a lăsat peste noapte la frigider. Centrifugarea s-a făcut apoi timp de 45 min la 5 000 g și la temperatura de 1 °C.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Denaturarea serului 30 min. la 56 °C (fig. 1). Comparînd liniile de precipitare obținute în urma reacției între proteina serică nativă și antiserul omolog (fig. 1, a) cu cele obținute între proteina serică denaturată și același antiser, nu putem constata (fig. 1, b) o modificare vizibilă.

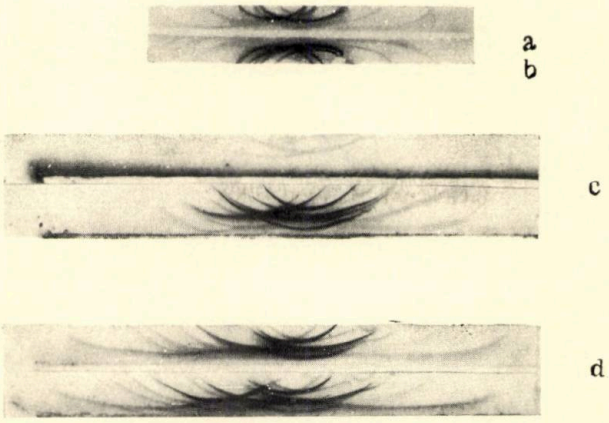


Fig. 1. — Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor serice în urma denaturării timp de 30 min., la 56 °C.

a) Imunoelectroforegrama serului normal cu antiserul omolog. *b*) Imunoelectroforegrama serului denaturat cu acelaşi antiser ca mai sus. *c*) Imunoelectroforegrama serului normal cu antiserul omolog (jos) şi cu acelaşi antiser absorbit cu ser denaturat (sus). *d*) Imunoelectroforegrama obţinută cu serul normal şi antiserul omolog (jos) şi acelaşi ser şi antiserul preparat cu proteine denaturate (sus).

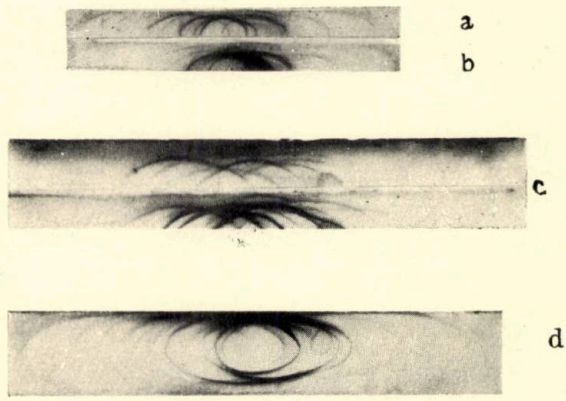


Fig. 2. — Modificarea proprietăţilor antigenice ale proteinelor serice în urma denaturării timp de 30 min., la 60 °C.

a) Imunoelectroforegrama serului normal cu antiser omolog. *b*) Imunoelectroforegrama serului denaturat cu acelaşi antiser ca mai sus. *c*) Imunoelectroforegrama serului normal cu antiserul omolog (jos) şi cu acelaşi antiser absorbit cu ser denaturat (sus) *d*) Imunoelectroforegrama obţinută cu serul normal şi antiserul omolog (sus) şi acelaşi ser şi antiserul preparat cu proteine denaturate (jos).

Observațiile sînt însă îngreuiate de prezența numeroaselor linii, dintre care o parte nu au putut fi redate fotografic.

În experiențele în care s-au efectuat reacțiile cu antiser absorbit cu ser denaturat, apar însă unele modificări evidente. În figura 1 c prezentăm imaginea imunoelectroforetică a serului normal realizată cu antiserul omolog (șanțul de jos) și cu același antiser absorbit cu ser denaturat 30 min. la 56 °C (șanțul de sus). Se poate observa că, în urma denaturării, serul își modifică antigenicitatea. În zonele alfa și beta rămîn 4 linii care nu au putut fi eliminate prin absorbția antiserului cu ser denaturat. Trebuie să precizăm însă că la această temperatură ne aflăm, probabil, la limita denaturării și că rezistența față de denaturare nu este identică de la ser la ser, deoarece în cazul unor seruri nu au rămas decît 2 sau 3 linii în loc de 4. Avem lucrări în curs pentru a stabili cauzele acestei diferențe. Ea ar putea fi pusă în legătură cu starea fiziologică și eventual patologică a organismului de la care s-a recoltat serul. În acest caz am avea de-a face cu modificări fine, sesizabile numai pe această cale, deoarece serul provenea de la persoane considerate normale.

În figura 1 d prezentăm imunoelectroforegrama obținută cu ser normal și antiseruri preparate folosind ca antigen serul normal (șanțul de jos) și serul denaturat 30 min. la 56 °C (șanțul de sus). Din examinarea liniilor de precipitare am constatat o scădere a numărului lor în zonele alfa și beta. Liniile dispărute sînt corespunzătoare cu liniile păstrate în experiențele înfățișate mai sus.

Denaturarea serului 30 min. la 60 °C. Experiențele efectuate au fost de același tip ca și cele din cazul serului denaturat la 56 °C. De data aceasta însă modificările sînt mult mai evidente.

În figura 2 prezentăm imunoelectroforegrama serului nativ (fig. 2, a) și a celui denaturat 30 min. la 60 °C (fig. 2, b), folosind antiserul obținut prin hiperimunizarea iepurilor cu ser sanguin uman nativ. Se observă că prin această denaturare antigenicitatea serului se modifică sensibil. Astfel, se poate observa o slăbire a liniilor albuminei, a gammaglobulinei și a unei linii din zona $alfa_1$. În zona $alfa_2$ și beta se constată dispariția completă a cîte două linii. Aceste modificări apar net folosind la imunoelectroforeza serului nativ antiserul omolog absorbit cu ser denaturat (fig. 2, *c*). Se constată că, în urma absorbției complete cu ser denaturat, se păstrează totuși anticorpii anti-albumină și cei specifici unor fracțiuni antigenice din zona $alfa_1$ (1 linie), din zona $alfa_2$ (2 linii) și beta (2 —3 linii), ceea ce arată că în urma tratamentului termic aceste antigene au suferit o denaturare.

Experiențele efectuate migrînd serul normal și folosind serul de iepure imun antiproteine serice native (fig. 2, d, șanțul de sus) și antiproteine serice denaturate (fig. 2, d, șanțul de jos) arată de asemenea că antigenitatea fracțiunilor albuminice, $alfa_1$, $alfa_2$ (2 linii) și beta (2 linii) este modificată în urma termodenaturării. De asemenea se observă o slăbire a liniilor albuminei și gamma-globulinei.

Precizări asupra naturii fracțiunilor proteice a căror antigenitate se modifică în urma denaturării termice vom aduce după obținerea acestor fracțiuni în starea de puritate necesară pentru reacțiile de identificare.

Privind în ansamblu rezultatele obținute, constatăm un fapt interesant, legat de rezistența inegală la denaturare a diferitelor fracțiuni electroforetice.

Astfel, se știe că în urma încălzirii proteinei serice la 60 °C mobilitatea electroforetică a albuminei scade, iar a gamma-globulinei crește, apărînd o nouă fracțiune, care se suprapune alfa- și beta-globulinei [9]. Au fost chiar autori [10] care pun în legătură acest fenomen cu posibilitatea transformării albuminelor și gamma-globulinelor în alfa- și beta-globuline. Aceste date păreau să indice că albumina și gamaglobulina sînt proteinele serice cele mai sensibile la denaturare.

Datele imunochimice pe care le aducem în această lucrare prezintă faptele sub o altă lumină. Astfel, se poate constata că denaturarea începe să aibă loc chiar de la 56 °C, înainte deci de a apărea fenomenul electroforetic de mai sus, denumit „omogenizare electroforetică". Mai interesant este însă faptul că primele afectate nu sînt albuminele și gamma-globulinele, ci tocmai fracțiuni din zonele alfa și beta, care își modifică antigenitatea chiar și la această temperatură.

În cazul denaturării la 60 °C, de asemenea nu apare o intensificare a liniilor din zonele alfa și beta, cum s-ar întîmpla dacă ar avea loc o transformare a albuminei și a gamma-globulinei în alfa- și beta-globuline. Aceste date arată că, de fapt, fracțiunea nou apărută este diferită de toate aceste fracțiuni, reprezentînd o nouă fracțiune denaturată, care se suprapune doar ca mobilitate electroforetică alfa- și beta-globulinei. Aceasta corespunde cu rezultatele noastre dintr-o lucrare anterioară [2], unde am arătat că fracțiunea denaturată diferă de alfa- și beta-globuline și este în întregime coacervabilă. În legătură cu această fracțiune vom reveni într-o altă lucrare.

Dispariția unor linii în urma încălzirii la 56 °C poate fi pusă în legătură cu lucrările lui Zimmer [11] și Müller-Eberhard [12] asupra complementului. Date fiind însă unele date contradictorii din aceste lucrări, mai sînt necesare experiențe de absorbție cu fracțiuni purificate pentru a se putea trage concluzii, după cum remarcă și Bier [13]. În orice caz, numărul și poziția liniilor modificate prin această încălzire arată în cazul nostru că, probabil, denaturarea nu se rezumă la complement, ci afectează și alte fracțiuni proteice.

CONCLUZII

1. Menținerea proteinelor serice timp de 30 min. la 56 °C produce o modificare a antigenității acestora, în zona alfa- și beta-globulinelor Această denaturare afectează, pe lîngă complement, și alte fracțiuni proteice.

2. Denaturarea proteinelor serice timp de 30 min. la 60 °C duce la o accentuare a modificărilor din zonele alfa- și beta-globulinelor, începînd să se contureze și schimbări la albumină și gamma-globulină.

3. Se aduce un nou argument în favoarea afirmației făcute într-o lucrare anterioară [2], că noua fracțiune apărută în cadrul procesului de

omogenizare electroforetică este o fracțiune antigenă independentă atît de albuminele și gammaglobulinele, din care provine, cît și de alfa- și beta-globuline, cărora li se suprapune doar ca mobilitate electroforetică.

Prezentată la redacție
la 24 iunie 1964

Institutul de biochimie
al Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. E. MACOVSCHI, M. CĂRSTEANU, *Coacervatele dintre proteinele serului sanguin uman și guma arabică.* St. cerc. biochim., **II**, *2*, 111 (1959).
2. D. MOTET-GRIGORAȘ, *Coacervarea fracțiunilor proteice din serul sanguin uman denaturat prin căldură*, St. cerc. biochim., **IV**, *2*, 257 (1961).
3. P. GRABAR, J. COURÇON, *Etude des sérums de cheval, lapin, rat et souris par l'analyse imunoélectrophorétique*, Bull. Soc. Chim. Biol., **40**, 1993 (1958).
4. V. GHETIE, D. MOTET-GRIGORAȘ, *Electroforeza și imunodifuzia proteinelor în gel de agaroză*, St. cerc. biochim., **V**, *3*, 409 (1962).
5. S. HJERTÉN, *Agarose as an anticonventional agent in electrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta, **53**, 518 (1961).
6. S. HJERTÉN, *A new method for preparation of agarose for gel electrophoresis*, Biochim. Biophys. Acta, **62**, 445 (1962).
7. B. RUSSELL, T. H. MEAD, A. POLSON, *method of preparing agarose*, Biochim. Biophys. Acta, **86**, 169 (1964).
8. J. J. SCHEIDEGGER, *Une microméthode de l'Immuno-électrophorèse*, Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol., **7**, 103 (1955).
9. R. ARDRY, *Recherches électrophorétiques sur le sérum humain chauffé. I. Étude du sérum normal*, Bull. Soc. Chim. Biol., **33**, 236 (1951).
10. G. V. TROITKI, V. I. OKULOV, D. A. SORKINA, *O vozmojnosti transformații albumina i γ-globulina plazma krovi v α- i β-globulini*, Biohimia, **26**, 44 (1961).
11. J. ZIMMER, *Aspects immuno-électrophorétiques du complément*, Bull. Soc. Franç. Dermatol. et Syphiligr., **67**, 616 (1960).
12. H. J. MÜLLER-EBERHARD, U. NILSSON, *Relation of a β_1 glycoprotein of human serum to the complement system*, J. Exp. Med., **111**, 217 (1960).
13. O. BIER, *Le complément : sa composition, son rôle dans les réactions d'hypersensibilité*, Exp. Ann. Bioch. Med., **22**, 105 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 399 – 405 (1964)

REACTIVITATEA BIOCHIMICĂ ŞI IMUNOLOGICĂ A MACROFAGULUI HISTIOID ÎN TUBERCULOZĂ

II. DIFERENŢE DE COMPOZIŢIE CHIMICĂ ÎNTRE MACROFAGELE COBAIULUI NORMAL ŞI VACCINAT B.C.G.*

EUGENIU PĂUNESCU

576.8.098

Rezumat. — Între macrofagele exsudatului peritoneal obţinut prin inocularea fracţiunii lipidice acetonosolubile, de origine bacilară ($H_{37}Rv$), la cobai normali şi vaccinaţi cu B.C.G. există deosebiri, evidenţiate cantitativ, care privesc : conţinutul proteic, concentraţia şi potenţialul antigenic al celor trei fracţiuni proteice separabile electroforetic din extractele macrofagice obţinute prin congelări repetate. Dintre cele trei fracţiuni separabile electroforetic, numai două manifestă un potenţial antigenic net. Extractele de macrofage provenite de la cobai imunizaţi prin vaccinare cu B.C.G. au un conţinut proteic mai mare şi prezintă o fracţiune de tip albuminic mai bogată şi cu un potenţial antigenic mai mare decît cea similară, prezentă în extractele de macrofage provenite de la cobai normali.

Cercetările lui Suter [1], Fong [2], Schellenberg [3] şi ale altor autori au demonstrat că, spre deosebire de macrofagul histioid provenit de la animalul normal, macrofagul de la animalul imunizat contra tuberculozei manifestă o rezistenţă evidentă contra multiplicării intracelulare a bacilului tuberculozei.

Aceste elemente celulare, provenite de la animalul imunizat prin vaccinare cu B.C.G., prezintă de altfel o intensificare a unor activităţi enzimatice strîns legate de procesele fiziologice de apărare celulară [4].

Pe de altă parte, numai histiocitele şi limfocitele unui animal imunizat sînt capabile să transfere în mod pasiv rezistenţa celulară unui alt animal, normal, neimunizat [5].

Aceste rezultate demonstrează rolul deosebit pe care celula fagocitară moleculară îl deţine în cadrul proceselor de apărare contra infecţiei tuberculoase şi indică, totodată, existenţa unor modificări structurale şi de compoziţie chimică între macrofagul „imunizat" şi cel provenit de la animalul normal. Investigarea unor asemenea deosebiri de compoziţie

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, 3 (1964), în limba franceză.

chimică, care ar putea constitui suportul material al modificărilor de rezistență induse prin vaccinarea specifică cu B.C.G., formează obiectul prezentei note.

MATERIAL ŞI METODE

Pentru investigarea diferențelor de compoziție chimică dintre macrofagele provenite de la animalul normal şi cele de la animalul vaccinat B.C.G., am utilizat extracte de exsudate peritoneale provenind de la două loturi de cîte 14 cobai neselecționați (cu greutatea între 410 şi 520 g), dintre care un lot primise — înainte cu 52 de zile — o inoculare intraperitoneală cu B.C.G. în cantitate de 10 mg microb semiumed pentru fiecare animal [4].

În vederea provocării exsudatului peritoneal, cobailor li s-au administrat intraperitoneal cîte 3 mg extract bacilar acetonosolubil (tulpina umană H37Rv), sub formă de suspensie în 2 ml soluție cloruro-sodică fiziologică (NaCl 0,85%). La 8 zile după inocularea lipidului bacilar, exsudatul peritoneal provocat a fost recoltat de la fiecare cobai cu cîte 40—50 ml soluție cloruro-sodică izotonică heparinată (10 μg/ml).

Exsudatele obținute au prezentat o formulă leucocitară cu predominanță monocitară netă, în cadrul limitelor descrise într-o lucrare anterioară [4].

Toate exsudatele provenite de la cobaii fiecărui lot au fost reunite şi s-a făcut numărătoarea elementelor leucocitare, pentru a se stabili densitatea lor. Apoi — după centrifugare repetată şi eliminarea eritrocitelor prin spălare cu apă distilată şi dublarea volumului cu o soluție cloruro-sodică 1,7% — centrifugatul final a fost reluat steril în baloane cu perle de sticlă, folosind apă distilată sterilă în cantitățile necesare pentru a se obține o concentrație de 5 miliarde leucocite într-un mililitru. Suspensiile au fost apoi supuse simultan la 5 congelări şi decongelări repetate.

Supernatantul final a constituit extractul de macrofage cu care s-au făcut determinări în vederea evidențierii unor eventuale modificări de structură chimică între macrofagele provenite de la animale normale (MHn) şi cele provenite de la animalele imunizate prin vaccinare cu B.C.G. (MHv). Determinările efectuate au fost de ordin chimic (substanțe azotate şi fosforate) electroforetic şi serologic.

Determinările chimice

a) Conținutul în N-total, N-acidosolubil şi N-proteic a fost determinat prin metoda Kjeldahl, folosind acidul tricloracetic (concentrație finală 4%) pentru precipitarea proteinelor [6];

b) Substanța proteică a fost calculată prin multiplicarea valorii determinate de N-proteic cu factorul 6,25;

c) Conținutul în P-total, P-anorganic şi P-organic a fost determinat prin metoda fotometrică Briggs [6], folosind pentru precipitarea ortofosfaților reactivul citric-magnezian [7], în cazul dozării P-organic.

Toate rezultatele au fost exprimate în mg/100 ml extract macrofagic.

Examenul electroforetic a fost efectuat atît prin metoda pe hîrtie (Whatman nr. 1), cît şi în coloană (Elektrophoresegerät E. 35 — C. Zeiss, Jena). În vederea examenului electroforetic, extractele macrofagice au fost concentrate de 8—9 ori (prin dializă dirijată contra unei soluții 30% de polivinil-pirolidonă).

Examenul serologic a fost efectuat după metoda Ouchterlony [8], folosind seruri imune obţinute la iepure cu ajutorul extractelor de macrofage. Schema de imunizare cuprindea 9 inoculări, la cîte 5 zile interval, dintre care:

— inoculările 1, 4 şi 7 au fost făcute subcutan, cu cîte 2 ml extract de macrofage suspendat într-un amestec de 2 ml ulei de parafină şi 6 mg ceruri C şi D obţinute din tulpina umană $H_{37}Rv$;

— restul inoculărilor au fost făcute intravenos, cu cîte 1,5 ml extract de macrofage.

La 10 zile de la ultima inoculare (55 de zile de la începutul imunizării), animalele au fost sîngerate şi serul obţinut a fost păstrat congelat, în fiole sterile.

În vederea efectuării reacţiilor încrucişate de dublă difuzie în gel (tip Ouchterlony), atît serurile imune cît şi antigenele (extractele macrofagice) au fost în prealabil concentrate de 4 ori, prin dializă dirijată, timp de 24 de ore la temperatura camerei, contra unei soluţii 25% de polivinil-pirolidonă (PVP).

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Determinările chimice, efectuate comparativ pe extractele de macrofage de la cobai normali (MHn) şi vaccinaţi B.C.G. (MHv), au arătat existenţa unor diferenţe, evidenţiate cantitativ, între cele două tipuri de extracte. După cum se observă din tabela nr. 1, principala deosebire interesează conţinutul proteic (N-proteic), care este net mai mare în cazul extractelor macrofagice provenite de la cobaii imunizaţi prin vaccinare B. C. G.

Tabela nr. 1

Compoziţia chimică a extractelor macrofagice

Componentele determinate	Extract de macrofage peritoneale provenite de la			
	cobai normal		cobai vaccinat B.C.G.	
	Valori directe (în mg/100 ml)	Valori raportate la N-total conţinut în probă	Valori directe (în mg/100 ml)	Valori raportate la N-total conţinut în probă
N — total	284	100	291	100
N — acidosolubil	276	97,1	280	96,2
N — proteic	8	2,9	11	3,9
Substanţă proteică	50	—	68,75	—
P — total	14	5,6	17	5,9
P — anorganic	13,8	4,9	15,9	5,4
P — organic	0,2	0,07	1,1	0,38

Examenul electroforetic (tabela nr. 2 şi fig. 1 şi 2) a arătat date similare cu cele chimice: o concentrare importantă a fracţiunii de tip albuminic (cu viteza de migrare cea mai mare în cîmpul electric la pH 8,6). Această dominare a fracţiunii de tip albuminic se observă atît în cazul electroforezei pe hîrtie cît şi în cazul analizei electroforetice în coloană de lichid (fig. 1 şi 2).

Tabela nr. 2

Analiza electroforetică a extractelor macrografice

Componentele determinate	Extract de macrofage peritoneale provenite de la	
	Cobai normal	Cobai vaccinat B.C.G.
Numărul fracțiunilor	3	3
Concentrația fracțiunilor (în ordinea vitezei de migrare):		
— valori procentuale	46,9; 38,2; 14,9	76,5; 15,3; 8,2
— valori absolute (mg proteină în 100 ml extract)	23,35; 19,20; 7,45	52,59; 10,51; 5,64

Analiza valorilor obținute în urma examenului electroforetic arată că între cele două tipuri de extracte macrofagice (MHn și MHv) există deosebiri atît în ceea ce privește repartiția procentuală a concentrațiilor proteice în fiecare fracțiune cît și în ceea ce privește valorile absolute ale acestor concentrații. Astfel, spre exemplu în cazul fracțiunii de tip albuminic (cu cea mai mare viteză de migrare în cîmpul electroforetic la pH 8,6) : în extractele macrofagice de la cobaiul normal această fracțiune constituie 46,9% din proteinele totale, avînd — în valori absolute — o con-

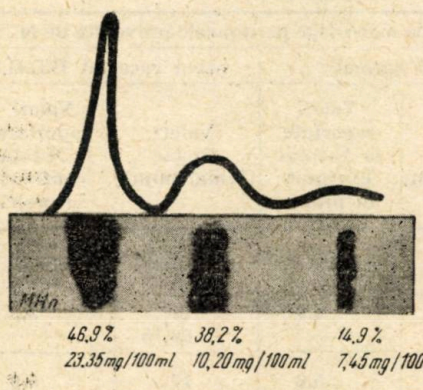


Fig. 1. — Separarea electroforetică a fracțiunilor proteice din extractul de macrofage de la cobaiul normal (*MHn*) prin metoda clasică (sus) și prin metoda pe hîrtie de filtru (jos).

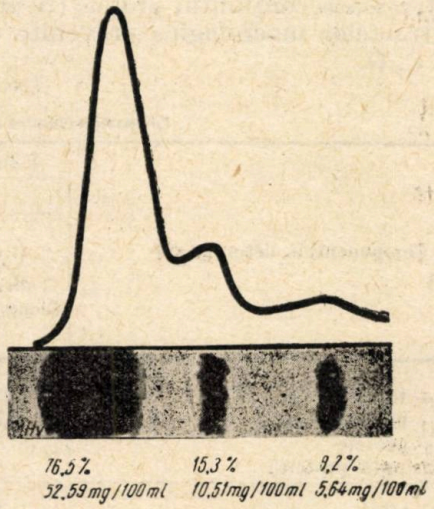


Fig. 2. — Separarea electroforetică a fracțiunilor proteice din extractul de macrofage de la cobaiul vaccinat cu B.C.G. (*MHv*), prin metoda clasică (sus) și prin metoda cu hîrtie de filtru (jos).

centrație de 23,35 mg/100 ml extract; aceeași fracțiune — în cazul extractului macrofagic de la cobaiul imunizat prin vaccinare B.C.G. — constitiue 76,5% din totalul proteinelor separate electroforetic și o valoare absolută a concentrației de 52,59 mg/100 ml extract.

Aceste rezultate demonstrează că valorile crescute ale conținutului proteic în cazul extractelor de macrofage provenite de la cobaii imunizați contra tuberculozei nu sînt rezultatul unei extracții mai complete decît cea realizată pentru macrofagele cobaiului normal, ci reflectă chiar diferențele existente în compoziția chimică a celor două tipuri de macrofage histioide analizate.

În legătură cu conținutul în proteină al monocitelor peritoneale de cobai obținute la 5 zile de la inocularea de glicogen, Colwell și colab. [9] menționează unele date cu care concordă rezultatele noastre. Astfel, în timp ce la cobaiul normal autorii găsesc $85,1 \pm 6,74$ μg proteină /10^6 celule din exsudat și $25,9 \pm 4,47$ μg proteină în fracțiunea cu particule obținută dintr-un milion de celule peritoneale supuse ultrasunetului, pentru celulele similare provenite de la cobai vaccinați B.C.G. aceste valori sînt mai mari : $88,9 \pm 10,1$ μg proteină/10^6 celule și, respectiv, $31,5 \pm 2,9$ μg proteină în fracțiunea cu particule obținută din celule prin supunere la ultrasunete. În ceea ce privește fracțiunea solubilă după supunerea la ultrasunete a celulelor din exsudatul peritoneal al cobailor, Colwell și colab. nu mai pot pune însă în evidență asemenea deosebiri în conținutul proteic între MHn și MHv. Autorii nu au analizat, de altfel, nici eventualele diferențe în compoziția unor fracțiuni proteice ale celor două tipuri de extracte mononucleare utilizate în experiențe.

Examenul serologic a avut drept scop precizarea diferențelor de potențial antigenic dintre fracțiunile proteice conținute în cele două extracte macrofagice studiate.

Rezultatele obținute prin reacția de dublă difuzie în gel, în cursul testării diferențelor de structură antigenică între extractele de macrofage provenite de la cobai normali (MHn) și imunizați (MHv), sînt schematizate în figura 3. După cum se observă, ambele extracte — în condițiile noastre experimentale — prezintă două dungi distincte de precipitare, care apar atît în prezența serului omolog, cît și în prezența celui eterolog. Între potențialul antigenic al celor două tipuri de extracte există însă unele diferențe cantitative, care de altfel au fost puse în evidență și prin celelalte investigații efectuate (determinările chimice și analiza electroforetică). Aceste diferențe constau în special în faptul că fracțiunea antigenică mai ușor difuzabilă din extractele macrofagice este mai concentrată în extractul MHv, în timp ce la extractul MHn fracțiunea antigenică mai greu difuzibilă are

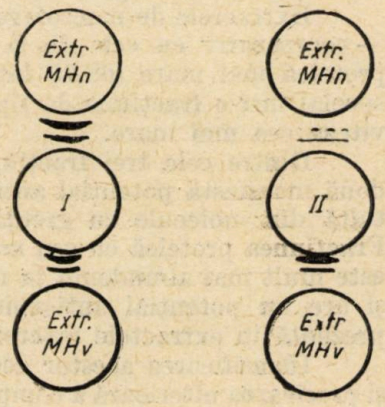


Fig. 3. — Schema precipitării în gel (metoda Ouchterlony) a extractelor macrofagice de la cobai normal (*Extr. MHn*) și de la cobai vaccinat cu B.C.G. (*Extr. MHv*), în prezența serurilor imune anti-*Extr. MHn* (I) și anti-*Extr. MHv* (II).

un potențial antigenic similar cu cel al fracțiunii ușor difuzibile (de tip albuminic).

Rezultatele investigațiilor serologice aduc deci noi argumente în favoarea admiterii existenței unor deosebiri de structură chimică între macrofagele provenite de la animalul normal și cele provenite de la animalul imunizat prin vaccinare cu B.C.G. Aceste deosebiri interesează în mod particular componentele proteice antigenice. Ele sînt evidențiabile cantitativ prin estimarea chimică a concentrației proteice în extractele macrofagice, prin analiza electroforetică și pe cale serologică.

În condițiile noastre experimentale, metoda dublei difuziuni în gel nu a putut pune în evidență decît două benzi de precipitare, corespunzătoare numai la două dintre cele trei fracțiuni separabile electroforetic. Aceasta ne determină să presupunem că cea de-a treia fracțiune electroforetică are un potențial antigenic extrem de redus, fiind, probabil, formată din peptide și din alte molecule mici, lipsite de calități antigenice.

O fracționare diferențiată a extractelor macrofagice și analiza subfracțiunilor obținute vor permite, foarte probabil, precizarea calitativă a deosebirilor de compoziție chimică dintre macrofagele de la animale normale și cele provenite de la animalele imunizate contra tuberculozei.

CONCLUZII

Între macrofagele peritoneale provenite de la animalul vaccinat contra tuberculozei și cele provenite de la animalul normal (sensibil la tuberculoză) există deosebiri în ceea ce privește compoziția chimică. Aceste deosebiri interesează în particular componentele proteice, extrase din macrofage prin congelări și decongelări repetate.

Extractele de macrofage provenite de la cobaiul vaccinat cu B.C.G. — comparativ cu cele de la cobaiul normal — prezintă o concentrație proteică mai mare (68,75 față de 50 mg/100 ml extract), localizată în special într-o fracțiune de tip albuminic, care migrează electroforetic cu viteza cea mai mare.

Dintre cele trei fracțiuni proteice separabile electroforetic, numai două manifestă potențial antigenic, cea de-a treia fiind, probabil, constituită din molecule cu greutate moleculară mică (peptide, aminoacizi). Fracțiunea proteică cu cea mai mare viteză de migrare în cîmpul electric este mult mai abundentă la macrofagele provenite de la cobaii imunizați și are un potențial antigenic mare, comparativ cu fracțiunea similară prezentă în extractele macrofagice de la cobaii normali.

Identificarea acestor deosebiri dintre cele două tipuri de macrofage și precizarea ulterioară a componentelor care creează această diferențiere pot contribui la înțelegerea mai aprofundată a mecanismelor de imunitate celulară dobîndită în tuberculoză, unde macrofagelor le revine un rol principal.

Prezentată la redacție
la 22 iunie 1964

Laboratorul de biochimie și fiziologie bacteriană al Institutului clinic de fiziologie, București

BIBLIOGRAFIE

1. E. SUTER, *Multiplication of tubercle bacilli within phagocytes cultivated in vitro and effect of streptomycin and isonicotinic acid hydrazide*, Amer. Rev. Tuberc., **65**, 775 (1952).
2. J. FONG, P. SCHNEIDER, S. S. ELBERG, *Studies on tubercle bacillus-monocyte relationship. I. Quantitative analysis on effect of serum of animals vaccinated with B.C.G., upon bacterium-monocyte system*, J. exp. Med., **104**, 455 (1956).
3. H. SCHELLENBERG, *Wechselbeziehungen zwischen makroorganismischen Zellen und Mycobacterien in der Gewebekultur*, Beitr. Klinik Tbk, **117**, 201 (1957).
4. EUG. PAUNESCO, E. HADÎRCĂ, *Réactivité biochimique et immunologique du macrophage histioïde en tuberculose. I. Activité déhydrogénasique et phosphatasique*, Rev. roum. Biochim., **1**, *2*, 183 (1964).
5. J. FONG, D. CHIN, S. S. ELBERG, *Studies on tubercle bacillus-histiocyte relationschip. V. Passive transfer of cellular resistance*, J. exp. Med., **115**, 475 (1963).
6. П. ДЖОРДЖЕСКУ, Е. ПЭУНЕСКУ, *Биохимические методы диагноза и исследования*, Медицинское изд., Бухарест, 1963.
7. AL. BULLA, EUG. PĂUNESCU E. HADÎRCĂ, *Dinamica modificărilor compoziţiei mediului de cultură în cursul dezvoltării Mycobacterium tuberculosis*, St. cerc. biochim., **VI**, *4*, 501 (1963).
8. O. OUCHTERLONY, *Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions. in co-ordinated reactions of diffusion*, Acta Path. Microb. Scand., **32**, 231 (1953).
9. C. A. COLWELL, A. R. HESS, M. TAVASTJERNA, *Mononuclear cells from animals of divergent susceptibility to tuberculosis. I. Enzymes studies*, Amer. Rev. Resp. Dis., **88**, *1*, 37 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 407 – 416 (1964)

VARIAȚIILE FIZIOLOGICE ALE ACTIVITĂȚII COLINESTERAZICE A PLASMEI LA OM*

AURORA POPESCU-ȘTEFĂNESCU și ELISABETA SEREDIUC

577.153

Rezumat. — În lucrare se studiază : variațiile activității colinesterazei plasmatice cu vîrsta ; relația dintre concentrația colinesterazei în sîngele mamei și în sîngele nou-născutului ; relația dintre activitatea colinesterazei plasmatice la bărbați și la femei ; zi variația colinisterazei plasmatice la aceeași persoană, în intervale relativ scurte de timp.

Activitatea colinesterazei plasmatice s-a determinat la 208 persoane : 26 de nou-născuți, 58 de copii și adolescenți (de la 3 la 17 ani), 124 de adulți (de la 18 la 76 de ani), dintre care 59 de bărbați și 65 de femei.

S-au obținut rezultatele următoare : Concentrația colinesterazei în plasma sîngelui matern este mare decît în plasma sîngelui ombilical. Concentrația medie găsită la mame (10 persoane) a fost da 68,3 unități (μlCO_2/min/ml plasmă), iar la nou-născuți de 59,1 unități ($P < 0,05$). În intervalul de la naștere pînă la 15 ani, concentrația enzimei nu prezintă vreo variație sistematică ; media pentru intervalul 3—15 ani a fost de 60,2 unități, valoare care nu se deosebește semnificativ de media 56,4 găsită la naștere ($P > 0,05$). Între 15 și 19 ani, activitatea colinesterazei plasmatice crește considerabil : de la 59,0 unități (media pentru intervalul 0—15 ani) la 83,5 unități (media pentru intervalul 18—19 ani) ($P < 0,001$). Între grupul de vîrstă 18—19 ani și cel imediat următor (20—24 de ani) se constată o scădere semnificativă a concentrației enzimei : de la 83, 5 unități la 67,4 unități ($P < 0,01$). Între 20 și 59 de ani, activitatea colinesterazei plasmatice crește apreciabil : media pentru grupul de 20—24 de ani a fost de 67,4 unități, iar pentru grupul de 50—59 de ani de 86,3 unități ($P < 0,001$). La persoanele mai înaintate în vîrstă (60—76 de ani), concentrația medie a enzimei a fost de 81,9 unități. Diferența dintre această valoare și media pentru grupul precedent nu este semnificativă. Activitatea colinesterazei plasmatice aflată la bărbați (media 83,4) a fost mai mare decît cea aflată la femei (media 75,6). Diferența dintre medii este semnificativă. Concentrația enzimei la aceeași persoană (s-au studiat 8 persoane) nu variază semnificativ în interval de 12—18 luni.

Variațiile activității colinesterazice a plasmei au fost studiate de numeroși cercetători, pe de o parte în speranța că ele ar putea lămuri semnificația fiziologică a enzimei, pe de altă parte cu ideea că, uneori, variațiile ar fi provocate de diverse afecțiuni și ar putea prezenta interes clinic.

* Lucrarea publicată în Rev. roum. Biochim., **2**, *1* (1965), în limba franceză.

Totuşi, în nici una dintre aceste direcţii nu s-a ajuns la rezultatele aşteptate : rolul fiziologic al enzimei a rămas neînţeles, iar concentraţia ei pare să prezinte variaţii sistematice numai în unele afecţiuni ale ficatului — hepatite, ciroză —, în care este scăzută ; însă în aceste afecţiuni scade şi concentraţia albuminei serice, cu care enzima este asociată, aşa încît constatarea nu pare deosebit de instructivă.

Examinarea lucrărilor anterioare conduce şi la o altă constatare, mai remarcabilă : cercetătorii care au studiat variaţiile fiziologice — cu vîrsta şi cu sexul — ale colinesterazei plasmatice au ajuns, de cele mai multe ori, la concluzii contradictorii. Vom semnala unele dintre aceste nepotriviri cînd vom discuta propriile noastre rezultate.

Cercetările pe care le prezentăm privesc în special variaţiile colinesterazei plasmatice cu vîrsta. Am mai cercetat, totodată şi următoarele probleme conexe : (*1*) relaţia dintre concentraţia colinesterazei în sîngele mamei şi în sîngele copilului imediat după naştere ; (*2*) relaţia dintre concentraţia colinesterazei plasmatice la bărbaţi şi al femei ; şi (*3*) variaţia activităţii colinesterazice la aceeaşi persoană, în intervale relativ scurte de timp. Am întreprins aceste cercetări cu scopul de a lămuri nepotrivirile pe care le-am întîlnit în literatură. Nu putem spune că am reuşit ; însă datele noastre, alături de cele anterioare, ne-au sugerat un punct de vedere care poate explica, eventual, aceste nepotriviri.

MATERIAL ŞI METODE

Dozarea enzimei. Determinarea activităţii colinesterazice s-a făcut cu ajutorul unei tehnici manometrice, asemănătoare celei propuse de Ammon [1]. S-au folosit diluţii de ser în soluţie Ringer-bicarbonat, cuprinzînd 2 ml ser în 25 ml diluţie. În flacoanele Warburg s-a introdus cîte 1 ml din această diluţie, iar substratul — 0,5 ml soluţie 0,135 M de acetilcolină sub formă de clorhidrat — s-a introdus în diverticul. Flacoanele au fost gazate 10 min cu un amestec de 95% O_2 şi 5 % CO_2 şi au fost echilibrate apoi în baie, la 37°, timp de 10 min. Degajarea de CO_2 a fost urmărită timp de 20 min şi citirile s-au făcut la intervale de 2 min şi 30 s. Activitatea colinesterazică specifică a probelor a fost exprimată în *unităţi de activitate* (U.A.) *cuprinse în 1 ml ser.* O unitate de activitate corespunde cantităţii de enzimă care, în condiţiile încercărilor, determină producerea de 1 μl CO_2 pe min.

Populaţia cercetată. Activitatea colinesterazei plasmatice s-a determinat la 208 persoane, repartizate în grupurile următoare :

(a) 26 de nou-născuţi ;

(b) 58 de copii şi adolescenţi (de la 3 la 17 ani) ;

(c) 124 de adulţi (de la 18 la 76 de ani), dintre care 59 de bărbaţi şi 65 de femei.

Dintre femei, 10 erau mame la care probele de sînge s-au luat imediat după naştere, cînd de asemenea s-au luat probe şi din sîngele nou-născuţilor (la tăierea cordonului ombilical). La 8 adulţi (bărbaţi şi femei) determinarea activităţii colinesterazice s-a repetat la un interval de circa 1 an.

REZULTATE

Datele privind copiii și adolescenții sînt prezentate în figura 1. Cei născuți în același an au fost grupați împreună, iar în grafic se dau media și deviația standard* pentru fiecare grup de vîrstă.

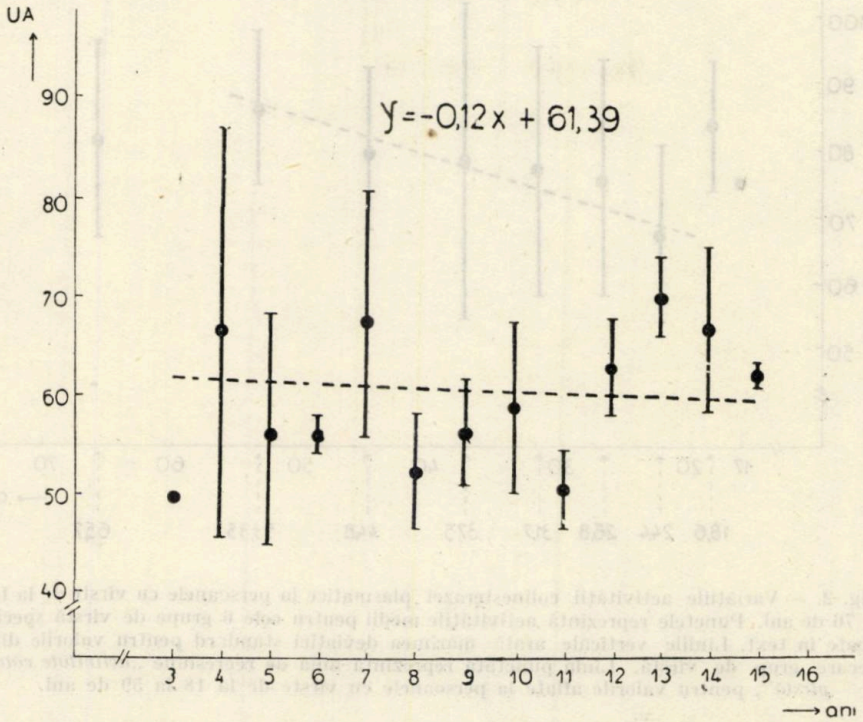


Fig. 1. — Variațiile activității colinesterazei plasmatice la copii. Punctele reprezintă mediile pentru vîrstele corespunzătoare. Liniile verticale arată mărimea deviației standard a valorilor din fiecare grup de vîrstă. Linia punctată reprezintă linia de regresiune *„activitate către vîrstă"*.

Activitățile aflate la adulți sînt prezentate în figura 2. Și de astă dată s-au reprezentat mediile și deviațiile standard pentru diversele grupuri de vîrstă. Acestea au fost astfel constituite, încît fiecare să cuprindă circa 15 persoane. Menționăm că activitățile aflate la repetarea determinărilor (vezi mai departe) nu au fost incluse în medii.

Datele privind cuplurile *mamă și nou-născut* sînt prezentate în tabela nr. 1. Pentru compararea activității colinesterazice la bărbat și la femeie,

* Deviația standard s-a calculat după formula :

$$\text{D. S.} = \sqrt{\frac{(\bar{x} - x_i)^2}{n - 1}}$$

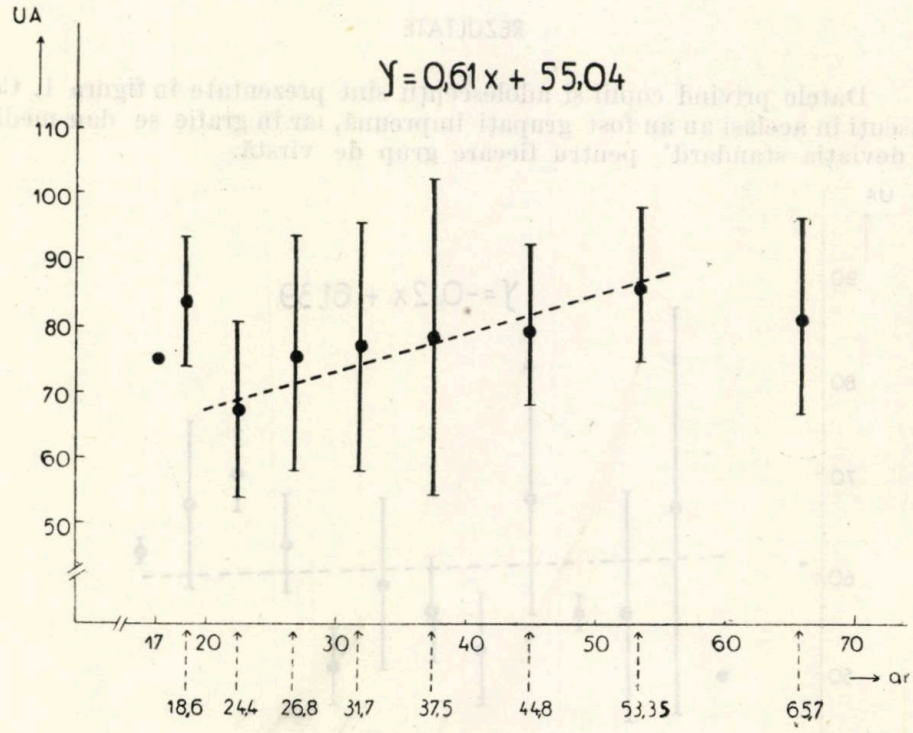


Fig. 2. — Variațiile activității colinesterazei plasmatice la persoanele cu vîrste de la 18 la 76 de ani. Punctele reprezintă activitățile medii pentru cele 6 grupe de vîrstă specificate în text. Liniile verticale arată mărimea deviației standard pentru valorile din fiecare grup de vîrstă. Linia punctată reprezintă linia de regresiune „*activitate către vîrstă*", pentru valorile aflate la persoanele cu vîrste de la 18 la 59 de ani.

Tabela nr. 1

Activitățile colinesterazice aflate la mame și la nou-născuți (în U.A./1 ml)

Nr.	Mamă	Nou-născut	Diferențe
1	82,0	63,0	−19,0
2	61,9	80,4	+18,5
3	65,9	55,5	−10,4
4	61,9	54,7	− 7,2
5	58,3	59,1	+ 0,8
6	66,3	57,7	− 8,6
7	64,6	50,3	−14,3
8	76,8	59,9	−16,9
9	68,8	58,3	−10,5
10	76,1	51,9	−24,2
Medii	68,3	59,1	− 9,2

Siguranța statistică a diferenței (medii) > 95%.

Tabela nr. 2

Diferența dintre activitățile colinesterazice la bărbați și la femei de vîrste între 18 și 76 de ani

Grupul de vîrstă (ani)	Vîrsta medie generală (ani)	Vîrsta medie bărbați (ani)	Vîrsta medie femei (ani)	Activitate colinesterazică medie (U.A./1 ml)			
				pentru tot grupul	pentru bărbați	pentru femei	diferențe
18—19	18,6	18,6	18,6	35,5	85,9	79,2	— 6,7
20—24	22,5	21,7	23,4	67,4	70,1	63,1	— 7,0
25—29	26,8	26,8	26,9	75,5	83,2	67,9	—15,9
30—34	31,7	32,2	31,3	77,0	80,9	73,1	— 7,8
35—39	37,5	37,3	37,6	78,6	88,6	73,4	—15,2
40—49	44,8	45,6	44,3	80,0	87,4	75,6	—11,8
50—59	53,3	53,3	53,3	86,3	91,1	81,0	—10,1
60—76	65,7	64,4	66,2	81,9	79,5	83,8	+ 4,3
Medii					83,45	75,63	— 7,82

Tabela nr. 3

Activitățile colinesterazice aflate la aceeași persoană la interval de circa 1 an (în U.A./1 ml)

Persoana	Intervalul dintre determinări (ani)	Prima determinare	A doua determinare	Diferențe
1	1	107,9	100,3	+ 7,6
2	1,5	77,2	64,2	+13,0
3	1	74,2	75,5	— 1,3
4	1	64,8	65,2	— 0,4
5	1	71,7	75,8	— 4,1
6	1,5	95,4	106,5	—11,1
7	1	70,7	61,9	+ 8,8
8	1,5	151,7	141,7	+10,0
Medii		89,2	86,4	+ 2,8

Diferența (medie) nu este semnificativă din punct de vedere statistic.

în tabela nr. 2 se dau activitățile medii aflate la bărbații și femeile din fiecare grup de vîrstă (de la 18 la 76 de ani). În fine, în tabela nr. 3 s-au consemnat activitățile colinesterazice găsite la persoanele la care s-a repetat determinarea.

DISCUȚIE

1. *Activitatea colinesterazică în plasma mamei și copilului la naștere.* Din datele consemnate în tabela nr. 1 se vede că, în genere, concentrația enzimei la nou-născut este mai mică decît la mamă. În cele 10 cazuri pe care le-am cercetat, activitatea specifică ** mijlocie a fost, pentru mame, de 68,3 U.A., iar pentru copii de 59,1 U.A. Diferența de 9,2 U.A. reprezintă circa 13% din concentrația pentru mame. Metoda „seriei

** Se reamintește că activitățile specifice sînt exprimate în unități de activitate într-un ml ser.

de perechi" arată că această diferenţă prezintă o siguranţă statistică de peste 95 % ($P < 0,05$).

Faptul că la naştere concentraţia enzimei este mai mică la copil decît la mamă a fost semnalat mai întîi de Navratil [2], în 1937. Acest autor nu a cercetat însă decît 3 cupluri mamă + copil. În 1949, McCance şi colab. [3] au publicat numeroase date cu privire la concentraţia enzimei (plasmatice) în sîngele prelevat din cordonul ombilical. Ei le-au comparat cu concentraţia mijlocie pentru un grup oarecare de adulţi (bărbaţi şi femei), nu cu concentraţia în sîngele matern. Valoarea mijlocie aflată pentru nou-născuţi (50 U.A.) nu diferă prea mult de cea găsită de noi. Concentraţia pentru grupul adulţilor este însă notabil mai ridicată decît cea pe care am aflat-o la mame; aşa încît, judecînd după datele acestor autori, s-ar putea crede că „filtrarea" sîngelui prin placentă duce la o scădere mai mare decît cea constatată de noi.

Menţionăm că date cu privire la activitatea colinesterazică a plasmei la mamă şi la nou-născut au mai fost publicate şi de către Pasetto [4] în 1956. Aceste date nu pot fi comparate imediat cu cele aduse de noi şi de McCance, căci au fost stabilite printr-o metodă diferită. Ele conduc însă, de asemenea, la concluzia că activitatea colinesterazei plasmatice este mai mică la nou-născut decît la mamă. Această concluzie este confirmată şi de unele date publicate recent de Stur şi Thalhammer [5].

2. *Date privind grupul de vîrstă 0—15 ani.* Figura 1 arată că nu există vreo variaţie sistematică a concentraţiei colinesterazei între 3 şi 15 ani. Într-adevăr, diferenţele dintre medii sînt foarte mici şi, desigur, nesemnificative, căci deviaţiile standard sînt foarte mari; pe de altă parte, linia de regresie a activităţii cu vîrsta este aproape orizontală. De aceea am socotit că putem trata datele individuale ca pe un grup omogen şi le-am calculat media generală, pe care am comparat-o cu media aflată pentru cei 26 de copii nou-născuţi. Media pentru primul grup este de 60,2 U.A., iar media pentru grupul nou-născuţilor este de 56,4 U.A. Cum diferenţa dintre medii nu este semnificativă ($P > 0,05$), putem conchide că de la naştere pînă la 15 ani activitatea colinesterazică nu variază în mod sistematic cu vîrsta. Grupul de vîrste 0—15 ani trebuie privit, prin urmare, drept o singură populaţie; iar media care-i corespunde este de 59,0 U.A.

De activitatea colinesterazei plasmatice la copii s-au ocupat în special McCance [6] şi colaboratorii săi (Hutchinson, Widdowson şi alţii). Ei au constatat că, de la 50 U.A. cît era la naştere, activitatea creşte în primele 3 săptămîni pînă la un nivel de circa 90 U.A., superior celui pe care l-au aflat la adulţi (76 U.A.). Faptul că activitatea creşte imediat după naştere fusese semnalat şi de Navratil (7) în 1939. Pe de altă parte, Hutchinson şi Widdowson (8) au publicat date după care la 5 ani activitatea ar fi de circa 100 U.A. atît la fete cît şi la băieţi. Creşterea ar continua, prin urmare, în toată prima copilărie. În schimb, de la 5 ani concentraţia ar scădea regulat pînă la 15 ani, cînd ar atinge nivelul caracteristic pentru adulţi. Date întrucîtva asemănătoare a publicat şi Kobyashi [9].

Cum nu am cercetat copii cu vîrste între 0 și 3 ani, nu putem spune nimic în privința creșterii imediat după naștere. Am cercetat însă 57 de copii cu vîrste de la 3 la 15 ani, și nici una dintre mediile anuale pe care le-am aflat nu depășește 65 U.A. ; pe de altă parte, datele noastre nu arată nici o tendință de scădere a concentrației între 5 și 15 ani. Cauza acestor nepotriviri este cu atît mai obscură, cu cît pentru nou-născuți și adulți am găsit practic aceleași activități ca și McCance și Kobyashi.

3. *Datele pentru grupul de vîrste 18—19 ani.* Adulții au fost împărțiți în 8 grupe de vîrstă, cuprinzînd fiecare 10—20 de persoane. Grupul celor de 18 și 19 ani cuprinde 19 persoane, 12 bărbați și 7 femei. Media activităților colinesterazice aflate pentru tot grupul (bărbați și femei) este de 83,5 U.A., cu D. S. = 9,27. Media pentru bărbați este de 85,9 (DS= 7,46) și cea pentru femei de 79,2 (D. S. = 11,16). După cum se vede și din figura 1, între 15 și 18—19 ani activitatea colinesterazică crește considerabil : de la 59,0 (media pentru grupul 0—15 ani) la 83,5, deci cu 24,5 U.A., adică cu circa 40% din activitatea pentru grupul 0—15 ani. Diferența dintre medii prezintă o siguranță statistică de peste 99,9% ($P < 0{,}001$). Prin urmare, cel puțin la populația de care ne-am ocupat, creșterea este neîndoielnică. În literatura pe care am cercetat-o, această creștere n-a mai fost semnalată.

4. *Datele pentru grupul de vîrstă 20—24 de ani.* Grupul a cuprins 13 persoane : 8 bărbați și 5 femei. Media generală pentru tot grupul este de 67,4 U. A. (D. S. = 13,05) ; media pentru bărbați este de 70,1 U.A. (D.S. = 7,73), iar cea pentru femei de 63,1 U.A. (D.S. = 19,17). Împreună cu datele privind grupul precedent, aceste medii arată că în intervalul de la 18 la 24 ani concentrația colinesterazei plasmatice scade mult : de la 83,5 la 67,4, deci cu 16,1 U.A., adică cu circa 20% din concentrația pentru grupul de 18—19 ani. Diferența dintre medii prezintă o siguranță statistică de peste 99% ($P < 0{,}01$).

Comparația mediilor parțiale — pe de o parte a celor pentru bărbați, pe de altă parte a celor pentru femei — confirmă semnificația acestei constatări. Diferența dintre mediile pentru bărbați (85,9—70,1=15,8) prezintă o siguranță statistică de 99,9% ($P < 0{,}001$), iar diferența dintre mediile pentru femei (79,2—63,1 = 16,1), deși din punct de vedere statistic puțin semnificativă ($0{,}1 > P > 0{,}05$), arată o scădere relativă mai mare decît cea aflată la bărbați. Pare probabil, de altfel, că în acest caz analiza statistică nu duce la un rezultat concludent numai fiindcă grupurile cercetate sînt prea mici (7 persoane în grupul de 18—19 ani și numai 5 persoane în grupul de 20—24 de ani).

5. *Evoluția activității colinesterazice de la 20 la 59 de ani.* Persoanele cu vîrste cuprinse în acest interval au fost împărțite în 6 grupuri de vîrstă : 20—24 de ani (cel despre care s-a tratat în paragraful precedent) ; 25—29 de ani (18 persoane, cu vîrsta medie de 26,8 ani) ; 30—34 de ani (12 persoane, cu vîrsta medie de 31,7 ani) ; 35—39 de ani (12 persoane, cu vîrsta medie de 37,5 ani) ; 40—49 de ani (16 persoane, cu vîrsta medie de 44,8 ani) ; și 50—59 de ani (17 persoane, cu vîrsta medie de 53,3 ani).

Activitatea colinesterazică mijlocie și deviația standard pentru fiecare grup sînt înscrise în figura 2. Examenul diagramei arată că me-

diile cresc regulat de la prima la ultima. Diferența dintre două medii succesive nu este totdeauna semnificativă din punct de vedere statistic. De aceea, pentru caracterizarea evoluției activității colinesterazice între 20 şi 59 de ani pare nimerit să se compare prima şi ultima medie. Cea pentru grupul de 20—24 de ani este de 67,4 (D.S. = 13,05), iar media pentru grupul de 50—59 de ani este de 86,3 (D.S. = 11,52). Ultima medie este mai mare decît prima cu 18,9 U.A., deci cu circa 27%. Această diferență prezintă o siguranță statistică de peste 99,9% ($P < 0{,}001$). Pe de altă parte, coeficientul unghiular (pozitiv) al liniei de regresiune *activitate/vîrstă* este semnificativ din punct de vedere statistic. Este sigur, prin urmare, că în grupul nostru de populație activitatea colinesterazică a crescut considerabil între 20 şi 59 de ani.

Această constatare nu concordă cu datele anterioare: Callaway şi colab. [10] şi Davies şi colab. [11] au constatat că activitatea colinesterazică a plasmei nu variază cu vîrsta (la adulți); pe de altă parte, din datele aduse de Shanor şi colab. (12) rezultă că activitatea rămîne constantă numai la femei şi scade la bărbați; iar Heim (13) şi Barrows (14) au constatat de asemenea scăderi ale activității cu vîrsta. După Barrows, la bărbați scăderea ar începe la 20 de ani şi ar fi liniară.

6. *Evoluția activității colinesterazice de la 60 la 76 de ani.* Persoanele cele mai vîrstnice pe care le-am cercetat au avut de la 60 la 76 de ani. Activitatea colinesterazică medie aflată pentru acest grup este de 81,9 U.A. (D.S. = 14,62). Ea este mai scăzută decît cea aflată pentru grupul 50—59 de ani (86,3), însă diferența dintre medii este de numai 4,4 U.A. şi nu este semnificativă din punct de vedere statistic ($P \simeq 0{,}3$), deşi amîndouă grupurile sînt îndeajuns de mari: cîte 17 persoane. Aşa încît ajungem la concluzia că concentrația colinesterazei plasmatice nu scade, în genere, în epoca senescenței.

7. *Diferența dintre activitățile colinesterazice la bărbați şi la femei.* În tabela nr. 2 s-au consemnat, pentru fiecare dintre grupurile de vîrstă în care au fost repartizați adulții, datele următoare: vîrsta medie generală; vîrsta medie pentru bărbați; vîrsta medie pentru femei; activitatea colinesterazică medie pentru bărbați; activitatea colinesterazică medie pentru femei. Examenul tabelei arată că, în 7 grupuri din 8, media pentru bărbați este notabil mai mare decît cea pentru femei. Mediile generale sînt: 83,4 pentru bărbați şi 75,6 pentru femei, iar diferența dintre ele este semnificativă ($P < 0{,}05$). Trebuie să conchidem, prin urmare, că activitatea este, în genere, mai mare la bărbați decît la femei. La aceeaşi concluzie au ajuns şi alți cercetători (Butt şi colab. [15], Zeller şi colab. [16], Fremont-Smith şi colab. [17] şi Rider şi colab. [18]), însă Callaway şi colab. [10] şi Davies şi colab. [11] au constatat, dimpotrivă, că activitatea colinesterazică mijloacie este aceeaşi la bărbați şi la femei. În fine, Shanor şi colab. [12] sînt de părere că activitatea este mai mare la bărbați decît la femei numai la oamenii tineri, căci cu vîrsta ea se egalizează.

8. *Variația activității colinesterazice cu timpul, la aceeaşi persoană.* La un număr de 8 persoane determinarea activității colinesterazei plasmatice a fost repetată la intervale de 12—18 luni. Perechile de valori obținute pentru fiecare persoană sînt consemnate în tabela nr. 3. Examenul

tabelei arată că, în genere, valorile aflate pentru aceeași persoană nu sînt considerabil diferite. De fapt, uneori ele sînt foarte apropiate. Media diferențelor pentru ansamblul persoanelor cercetate este de numai 2,8 U.A. și nu este semnificativă. De aceea trebuie să se admită că, în genere, concentrația colinesterazei plasmatice nu variază considerabil la aceeași persoană, în intervale de 1—2 ani. Menționăm că constanța relativă a concentrației enzimei în intervale mai scurte de timp (de maximum cîteva luni) a fost semnalată și de alți autori [10], [19], [20], [21].

CONCLUZII

Din cele de mai sus se vede că s-au efectuat cercetări îndeajuns de numeroase asupra variațiilor activității colinesterazei plasmatice cu vîrsta și cu sexul. Ele au condus, în genere, la rezultate contradictorii.

Luate împreună, datele noastre nu confirmă, nici chiar în linii mari, constatările vreunui grup de cercetători: uneori le contrazic, alteori arată variații care nu au mai fost semnalate. De fapt, împreună cu datele din literatură, rezultatele pe care le-am obținut par să demonstreze că la fiecare grup de populație mai mult sau mai puțin omogen concentrația colinesterazei plasmatice variază într-un mod particular și caracteristic.

Este de crezut, în aceste condiții, că nu există un tip uniform de variație (normală) a colinesterazei plasmatice cu vîrsta și cu sexul și că variațiile activității enzimei sînt influențate hotărîtor de factori necunoscuți; așa încît, pînă cînd acești factori nu vor fi descoperiți, nu este normal să se admită că studiul variațiilor ar putea ajuta la înțelegerea rolului fiziologic al enzimei. Trebuie să se rețină de altfel că, așa cum s-a arătat în timpul din urmă, există mai multe variante ale colinesterazei plasmatice controlate genetic [22], iar enzima ar putea juca un rol important în metabolismul acizilor grași [23].

Prezentată la redacție
la 22 februarie 1964

Laboratorul de chimie biologică I,
Institutul de medicină și farmacie,
București

BIBLIOGRAFIE

1. R. AMMON, Pflüg. Arch. ges. Physiol., **233**, 486 (1934).
2. E. NAVRATIL. Ztschr. f. Geburtsh. u. Gynäk., **114**, 146 (1937), după Ber. Ges Physiol. expt. Pharmakol., **100**, 488 (1937).
3. R. A. MCCANCE, Biochem. J., **45**, 464, 493 (1949).
4. N. PASETTO, Attualita ostet. e ginecol., **2**, 37 (1956), după Chem, Abstracts., **51**, 16 804 *b* (1957).
5. D. STUR, O. THALHAMMER, Wiener Z. Inn. Med. Grenz., **42**, 29 (1961).
6. R. A. MCCANCE, A. O. HUTCHINSON, R. F. A. DEAN, P. E. H JONES, *Intern. Congr. Biochem. Abstrs. of Communs, 1 st. Congr. Cambridge*, 591 (1949); după Chem. Abstr. **47**, 4390 *f*(1953).
7. E. NAVRATIL, Arch. Gynäk., **168**, 178 (1939).
8. A. O. HUTCHINSON, E. M. WIDDOWSON, Nature, **169**, 284 (1952).

9. M. KOBYASHI, Shinshu Igaku Zasshi, **8**, 1077 (1959), după Chem. Abstr., **56**, 13385 i (1962).
10. S. CALLAWAY, D. R. DAVIES, J . P. RUTLAND, Brit. Med. J., **2**, 812 (1951).
11. D. R. DAVIES, J. P. RUTLAND, Biochim. J., **47**, 21 (1950).
12. S. P. SHANOR, G. R. van HEES, N. BAART, E. G. ERDOS, F. F. FOLDES, Am. J. Med. Sci., **242**, 357 (1961).
13. F. HEIM, Klin. Wschr., **23**, 63 (1944), după K. B. Augustinson, Acta Physiol. Scand., **15**, supl. 52 (1948).
14. C. H. BARROWS Jr., N. W. SCHOCK, B. F. CHOW, J. Gerontol., **13**, 20, (1958).
15. H. R. BUTT, M. W. COMFORT, T. J. DRY, A. E. OSTERBERG, J. Lab. Clin. Med., **27**, 649. (1942).
16. H. BIRKHAUSER, E. A. ZELLER, Helv. Chim. Acta, **23**, 1460 (1940).
17. K. FREMONT-SMITH, W. VOLWILER, P. A. WOOD, J. Lab. Clin. Med., **40**, 692 (1952).
18. J. A. RIDER, J. L. HODGES, Jr., J. SWADER, A. D. WIGGINS, J. Lab. Clin. Med., **50**, 376 (1957).
19. R. AMMON, G. VOSS, Pflüg. Arch. ges. Physiol., **235**, 393 (1935).
20. E. M. JELLINEK, J. M. LOONEY, J. Biol. Chem., **128**, 621 (1939)).
21. T. von VEREBELY Jr., Klin. Wschr., **15**, 11 (1936).
22. H. W. GOEDDE, K. ALTAND, Nature, **198**, 1203 (1963).
23. J. W. CLITHEROW, M. MITCHARD, N. J. HARPER, Nature, **199**, 1000 (1963).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 2, 417 – 423 (1964)

UNELE ASPECTE BIOCHIMICE ALE METABOLISMULUI METIONINEI ÎN ULCERUL DUODENAL ŞI GASTRIC*

I. SZANTAI, T. HOLAN, A. FODOR şi S. COTUL

577.1

Rezumat. — Cu ajutorul unei metode originale cu metionină ^{35}S s-a cercetat metabolismul metioninei la bolnavi cu ulcer duodenal şi gastric. În ulcerul duodenal, viteza de metabolizare a metioninei ^{35}S creşte apreciabil, fiind exprimată printr-o eliminare crescută de metaboliţi urinari, fără creşterea eliminării de metionină neutilizată. Aceste modificări sînt de scurtă durată şi corespund cu faza de activitate a bolii. Acest fenomen se explică prin participarea metioninei la procesele de transmetilare. Bolnavii cu ulcer gastric, studiaţi în aceleaşi condiţii, nu prezintă modificări ale metabolismului metioninei.

Într-o lucrare anterioară [7] s-a stabilit că la bolnavii cu ulcer duodenal în fază de activitate se produc modificări caracteristice ale metabolismului metioninei. Aceste modificări au fost puse în evidenţă cu ajutorul unei metode originale [16], urmărind eliminarea urinară timp de 72 de ore a metaboliţilor metioninei, după administrarea intravenoasă de metionină ^{35}S (2 mc/kg corp), în comparaţie cu un lot de bolnavi cu ulcer gastric şi cu un lot martor. Rezultatele sînt prezentate în tabela nr. 1.

Examinînd datele din tabela 1 se constată că, în ulcerul duodenal, viteza de metabolizare a metioninei este apreciabil crescută în comparaţie cu lotul martor sau cu lotul cu ulcer gastric. Această creştere a vitezei de metabolizare este exprimată prin eliminarea mai intensă de metaboliţi urinari ai metioninei ^{35}S. Nu se constată creşterea eliminării de metionină nemetabolizată, caracteristică pentru cazurile de leziuni hepatice [8], [17]. Aceste rezultate nu sînt în concordanţă cu unele date din literatură [11] care nu semnalează modificări ale metabolismului metioninei în ulcerul duodenal.

Avînd în vedere analogiile aparente observate în cazurile de ulcer duodenal şi de hepatită cronică, prezentăm comparativ rezultatele obţinute (tabela nr. 2). Analizînd aceste date, se constată că valorile determinărilor radiometrice globale sînt de acelaşi ordin de mărime în ambele cazuri. Metabolismul metioninei în ulcerul duodenal prezintă totuşi aspecte specifice compartiv cu hepatita cronică. Acest fapt a fost pus în evidenţă prin radiocromatografia aminoacizilor şi aminelor sulfurate

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965) în limba franceză.

urinare ^{35}S. Astfel, creşterea globală a fracţiunii aminoacidice şi aminice ^{35}S în ulcerul duodenal se datoreşte eliminării ridicate de taurină. De asemenea se constată o scădere apreciabilă a eliminării de metionină neutilizată, care ajunge uneori chiar la absenţa totală din urină, spre deosebire de hepatita cronică, unde există în mod constant o eliminare cres-

Tabela nr. 1

Valorile eliminărilor urinare globale de ^{35}S şi de aminoacizi şi amine ^{35}S, determinate la 24, 48 şi, respectiv 72 de ore după administrare de metionină ^{35}S la martori normali, bolnavi de ulcer duodenal şi ulcer gastric. Rezultatele sînt exprimate în procente faţă de doza administrată

	Eliminări urinare de ^{35}S				Eliminare urinară de aminoacizi şi amine ^{35}S			
	24 h	48 h	72 h	Global	24 h	48 h	72 h	Global
Normali 16 cazuri (martori)	14,6	2,1	1,2	17,9	5,48	0,59	0,16	6,23
±	4,7	0,6	0,5	5,3	2,61	0,34	0,09	3,43
Ulcer duodenal 39 de bolnavi	32,9	5,2	2,4	40,5	10,6	0,99	0,50	18,09
±	10,2	2,2	1,1	13,3	5,50	0,68	0,89	4,18
Ulcer gastric 19 bolnavi	19,7	3,6	1,2	24,5	6,14	0,55	0,08	6,47
±	8,2	1,2	0,7	7,4	3,01	0,37	0,03	2,81

Tabela nr. 2

Valorile eliminărilor urinare globale de ^{35}S şi de aminoacizi şi amine ^{35}S, determinate la 24 ,48 şi respectiv, 72 de ore după administrarea de metionină ^{35}S, la bolnavi de ulcer duodenal şi hepatită cronică. Rezultatele sînt exprimate în procente faţă de doza administrată

	Eliminări urinare de ^{35}S				Eliminări urinare de aminoacizi şi amine			
	24 h	48 h	72 h	Global	24 h	48 h	72 h	Global
Ulcer duodenal 39 de bolnavi	32,9	5,2	2,4	40,5	10,6	0,99	0,50	18,09
±	10,2	2,2	1,1	13,3	5,50	0,68	0,89	4,18
Hepatită cronică 24 de bolnavi	39,9	5,0	2,8	47,7	17,24	1,29	0,72	19,25
±	11,4	1,7	1,3	11,5	6,62	0,54	0,56	6,51

cută de metionină ^{35}S nemetabolizată. Aceste rezultate sînt prezentate în tabela nr. 3. Ele reprezintă, în procente relative, valorile obţinute prin fotometrarea autoradiogramelor.

Din analiza datelor tabelei nr. 3 reiese că, în ulcerul duodenal, accentul cade pe intensificarea metabolismului metioninei, fapt exprimat şi

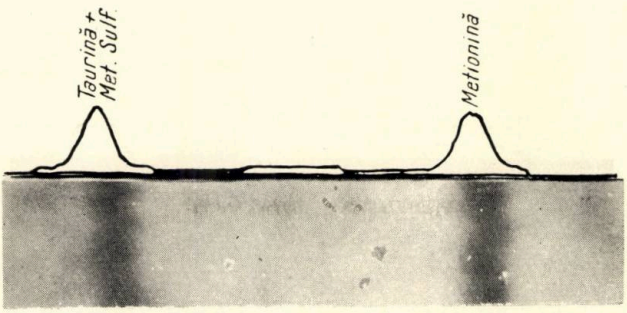
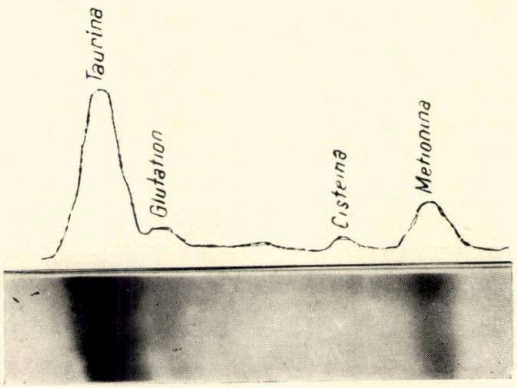
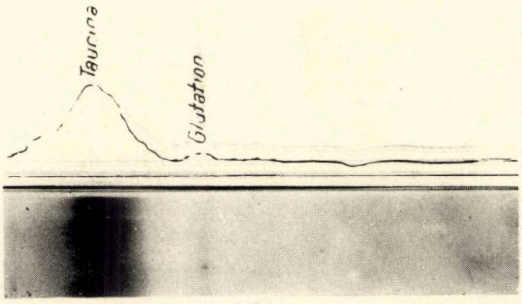


Fig. 1. — Radiocromatograma aminelor şi aminoacizilor urinari ^{35}S la martori normali.



a



b

Fig. 2. — Radiocromatograma aminelor şi aminoacizilor urinari ^{35}S la bolnavi cu ulcer duodenal.

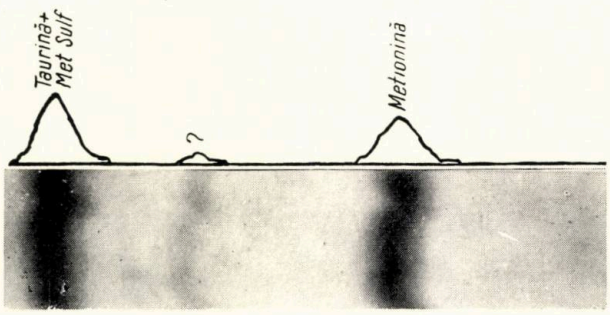


Fig. 3. — Radiocromatograma aminelor și aminoacizilor urinari ^{35}S la bolnavi cu ulcer gastric.

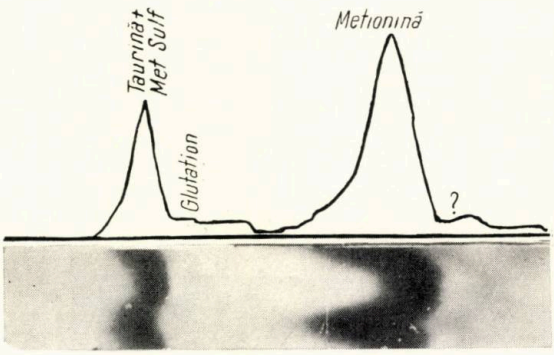


Fig. 4. — Radiocromatograma aminelor și aminoacizilor urinari ^{35}S la bolnavi cu hepatită cronică.

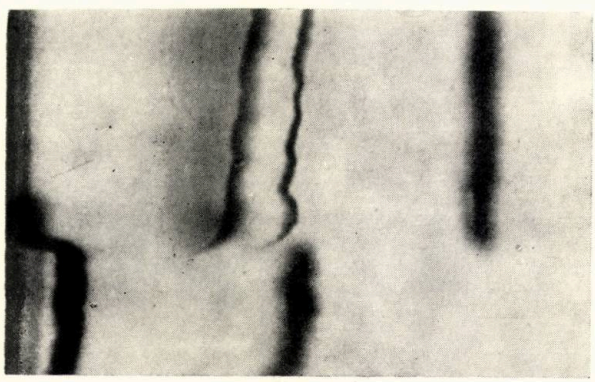


Fig. 5. — Radiocromatograma cetotioaminoacizilor urinari ^{35}S extrași cu Amberlit I.R. 120, la bolnavi cu ulcer duodenal.

prin creşterea raportului taurină/metionină. Aceste fapte sînt ilustrate şi de radiocromatogramele aminelor şi aminoacizilor ^{35}S urinari, efectuate la bolnavi de ulcer duodenal, ulcer gastric şi hepatită cronică, în comparaţie cu martori sănătoşi (fig. 1,2, 3 şi 4).

Tabela nr. 3

Valorile determinărilor de taurină ^{35}S şi metionină ^{35}S extrase cu Amberlit I.R. 120 din fracţiunea aminoacidică şi aminică ^{35}S a urinei de 24 de ore, la bolnavi cu ulcer duodenal, ulcer gastric, hepatită cronică şi la martori normali. Rezultatele sînt exprimate în procente relative (1), în procente faţă de doza administrată (2) şi prin raportul taurină/metionină

	Taurină (1)	Metionină (1)	Raport taurină / metionină	Taurină (2)	Metionină (2)
Ulcer duodenal	70,6	25,2	2,8	7,48	2,67
Ulcer gastric	53,2	34,1	1,61	3,27	2,29
Hepatită cronică	44,6	49,2	0,91	7,68	8,48
Normali	54,1	42,7	1,27	2,96	2,31

Pentru a obţine un tablou mai complet al metabolismului tioaminoacizilor, s-a efectuat şi radiocromatografia cetotioacizilor ^{35}S urinari (fig. 5). Aceştia au fost obţinuţi, după extragerea aminelor şi aminoacizilor, prin extracţie cu Amberlit I.R. 410. S-a găsit că sînt prezenţi în urină în proporţie de 4 —5% faţă de doza administrată. Această prezenţă constantă în urina bolnavilor de ulcer duodenal, a cetotioacizilor ca metaboliţi urinari ai metioninei, nu poate fi pentru moment interpretată, datorită lipsei de date comparative.

Pornind de la unele date actuale din literatură referitoare la metabolismul metioninei [1] [2] [13] [18] [19] [20], completate cu rezultatele expuse mai sus, şi ţinînd seama de unele mecanisme posibile, bazate pe ipoteze prezentate într-o lucrare anterioară (7), am alcătuit schema 1 pe care o redăm mai jos.

Deci modificările semnalate mai sus ale metabolismului metioninei în ulcerul duodenal sînt exprimate prin:

— intensificarea vitezei de metabolizare, exprimată prin creşterea eliminării globale de ^{35}S;

— scăderea eliminării de metionină ^{35}S nemetabolizată şi, în unele cazuri, chiar absenţa ei din urină;

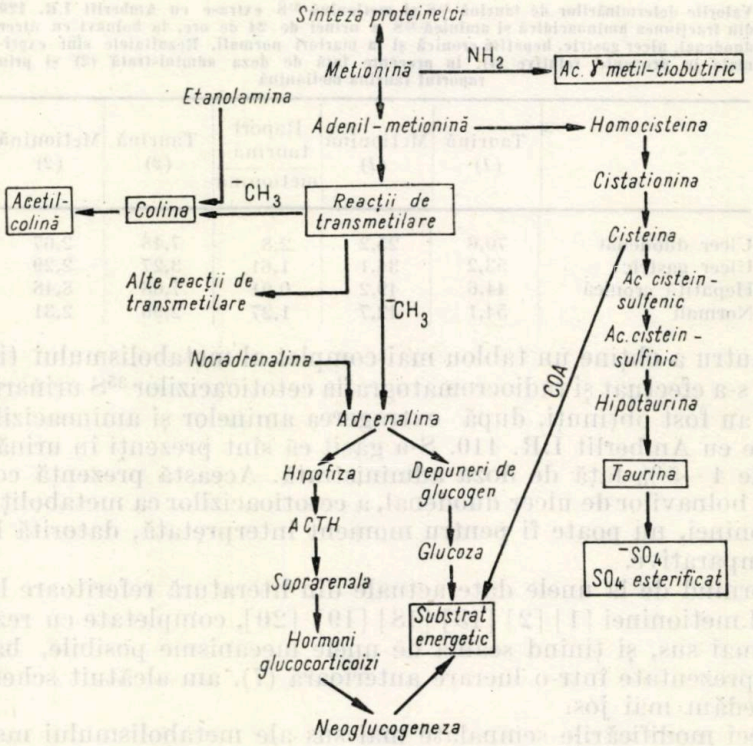
— creşterea fracţiunii sulfaţilor (sulfaţi liberi şi esterificaţi);

— creşterea cantităţii de taurină urinară, care are ca rezultat modificarea raportului taurină/metionină din urină.

Astfel, pe baza datelor obţinute se poate trage concluzia că în ulcerul duodenal are loc o intensificare a proceselor de transmetilare, modificările semnalate mai sus fiind expresia directă a acestui fenomen.

Pronind de la schema 1 şi de la unele date actuale privitoare la patogeneza ulcerului duodenal [3], [4], [5], [6], [9], [10], [12], se poate considera că intensificarea proceselor de transmetilare ar fi condiţionată de mai mulţi factori. Am exclus posibilitatea transmetilării pentru sinteza de creatinină, carnitină sau pentru procesele de detoxifiere directă prin gru-

parea metil, deoarece nu se pot încadra în complexul patogenetic al ulcerului duodenal. Unul dintre factorii care ar putea contribui la intensificarea transmetilării în ulcerul duodenal ar fi sinteza colinei, precursor al acetilcolinei, care participă la întreținerea tonusului vagal ridicat, caracteristic



Schema 1

acestei boli [3], [4]. Un alt factor posibil ar fi și sinteza crescută de adrenalină, la care metionina are o participare exclusivă [15] prin procesele de trasmetilare. Ținînd seama de participarea adrenalinei la sindromul general de adaptare (Long, citat după [14]), precum și de faptul că bolnavii cercetați se aflau în plină fază de activitate a bolii, considerăm că intensificarea sintezei de adrenalină ar putea fi expresia stării de solicitare din această fază a bolii. În acest sens pledează și eliminarea globală crescută de ^{35}S urinar după 48 și 72 de ore în ulcerul duodenal, în comparație cu martorii (tabela nr. 1 și fig. 1). Acest fenomen poate fi considerat ca o expresie a mobilizării metioninei datorită cataboliză crescute a proteinelor tisulare și ar putea fi interpretat ca o intensificare a neoglucogenezei în stări de suprasolicitare sau ca o catabolizare crescută a proteinelor tisulare, pentru acoperirea necesității de metionină.

În sfîrșit, creșterea apreciabilă a taurinei și a sulfaților urinari, observată la bolnavii cu ulcer duodenal, arată o intensificare a proceselor oxidative la aminoacizii sulfurați (schema 1).

Tabela nr. 4

Valorile eliminărilor urinare globale de ^{35}S și de aminoacizi și amine ^{35}S, determinate la 24, 48 și, respectiv, 72 de ore după administrare de metionină ^{35}S, la bolnavi de ulcer duodenal, înainte și după repaus la pat. Rezultatele sînt exprimate în procente față de doza administrată

	Eliminări urinare de ^{35}S				Eliminări urinare de aminoacizi și amine ^{35}S			
	24 h	48 h	72 h	Global	24 h	48 h	72 h	Global
17 bolnavi cu ulcer duodenal, înainte de repaus la pat	40,7	6,8	3,1	50,8	11,59	1,38	0,34	13,31
17 bolnavi cu ulcer duodenal, după repaus la pat	18,2	4,3	1,2	23,7	8,05	0,58	0,16	8,79
4 bolnavi cu ulcer duodenal cu răspuns negativ, înainte de repaus la pat	24,6	2,0	1,3	27,9	8,12	0,22	0,09	8,43
4 bolnavi cu ulcer duodenal cu răspuns negativ, după repaus la pat	24,5	2,9	0,70	28,0	6,94	0,38	0,03	7,37

Pentru a preciza mai bine modificările metabolismului metioninei în ulcerul duodenal, s-a aplicat o a doua încărcare cu metionină ^{35}S la un lot de 21 de bolnavi, după repaus de 7 zile la pat. Rezultatele sînt prezentate în tabela nr. 4, în comparație cu valorile obținute după prima încărcare.

Examinînd datele expuse în tabela 4, se constată că 17 din cei 21 de bolnavi cu ulcer duodenal (81% din cazurile studiate), prezintă după 7 zile de repaus la pat, o tendință netă de normalizare a eliminărilor urinare de metaboliți ^{35}S ai metioninei, care corespunde cu ieșirea din faza dureroasă a bolii. La patru bolnavi, valorile corespunzătoare celor două încărcări cu metionină ^{35}S rămîn practic neschimbate (răspuns negativ la repausul la pat).

Astfel, reiese că modificările metabolismului metioninei, exprimate prin creșterea vitezei de metabolizare, nu sînt de lungă durată, ci se încadrează, probabil, numai între limitele fazei de activitate a bolii. Determinarea fracțiunilor radiocromatografice, efectuată comparativ la 5 bolnavi, cu ocazia celor două încărcări cu metionină ^{35}S (tabela nr. 5), pledează în același sens.

Creșterea vitezei de metabolizare a metioninei pentru o perioadă relativ scurtă, în cazurile de ulcer duodenal, deschide problema posibilității existenței unei leziuni biochimice reversibile de tip „lipsă de substrat" metioninic la nivelul sintezei proteinelor. Acest deficit de substrat metioninic este de scurtă durată, organismul avînd posibilitatea să-l com-

penseze printr-un regim alimentar normal. O expresie a capacităţii de compensare a acestei leziuni de către organism este scăderea eliminării urinare de metionină, care merge uneori pînă la absenţa totală din urină (fig. 2, *b*).

În acest sens pledează şi unele rezultate preliminare obţinute cu ocazia administrării timp de 6 zile a acetilmetioninei (în doză de 2 g pe zi) în timpul repausului la pat, între cele două încărcări cu metionină ^{35}S; aceste rezultate vor forma obiectul unei note viitoare.

Tabela nr. 5

Valorile determinărilor de taurină ^{35}S şi metionină ^{35}S extrase cu Amberlit I.R. 120 din fracţiunea aminoacidică şi aminică ^{35}S a urinei de 24 de ore, la 5 bolnavi de ulcer duodenal, înainte şi după repaus la pat. Rezultatele sînt exprimate în procente relative (1), în procente faţă de doza administrată (2) şi prin raportul taurină/metionină

	Taurină (1)	Metionină (1)	Raportul taurină metionină	Taurină (2)	Metionină (2)
5 bolnavi cu ulcer duodenal, înainte de repaus	77,5	16,6	4,4	8,98	1,92
5 bolnavi cu ulcer duodenal, după repaus	64,3	25,7	2,4	5,18	2,07

Bolnavii cu ulcer gastric în faza dureroasă, studiaţi în aceleaşi condiţii, nu prezintă modificări ale vitezei de metabolizare a metioninei (tabelele nr. 1 şi 3), fapt ce indică unele deosebiri în metabolismul acestui aminoacid la cele două localizări ale bolii ulceroase.

CONCLUZII

Urmărind modificările metabolismului metioninei în ulcerul duodenal şi gastric, în comparaţie cu un lot de indivizi normali, s-a constatat:

1. Creşterea apreciabilă a vitezei de metabolizare a metioninei ^{35}S în ulcerul duodenal, cu eliminare crescută de metaboliţi ai metioninei, fără creşterea eliminării de metionină neutilizată.
2. Modificările semnalate sînt o expresie directă a intensificării proceselor de transmetilare.
3. Creşterea vitezei de metabolizare este de scurtă durată şi corespunde cu faza de activitate a bolii.
4. Bolnavii cu ulcer gastric, studiaţi în aceleaşi condiţii, nu prezintă modificări ale metabolismului metioninei.

Prezentată la redacţie
la 15 iunie 1964

Centrul de medicină nucleară, Cluj
şi
Clinica a III-a Medicală, Cluj

BIBLIOGRAFIE

1. CANTONI, Gl., J. Amer. Chem. Soc. **74**, 1942 (1952).
2. CANTONI, Gl., J. Biol. Chem., **204**, 403 (1953),
3. DRAGSTEDT, L. R., Amer. J. Dig. Dis., **6**, *1*, 89—93. (1961).

4. DRAGSTEDT, L. R., OBERHELMANN, H. A., EVANS, S. P., RIGLER, S. P., Lyon Chir., **50** *2*, 129–136 (1955).
5. FODOR, O., Arch. Mal. App. Dig., **47**, *7–8*, 815–843 (1958).
6. FODOR, O., ALDEA, G., DUMITRAȘCU D., POPESCU, S., Arch. Mal. App. Dig., **51**, *12*, 1497–1506 (1962).
7. FODOR, O., COTUL, S., SZANTAI, I. FĂRCĂȘANU, M. ABRUDAN, R., Cong. Internat. gastro-entérol., Bruxelles, 1964.
8. FODOR, O., SURIANU P., TRAGOR, S., COTUL S., SZANTAL I., HOLAN, T., FĂRCĂȘANU, M., Med. int., **XV**, *4*, 463–472 (1963).
9. FODOR, O., Med. int., **XV**, *10*, 1167–1177 (1963).
10. GOLDENBERG, N., BLUM, M., OSTAP, B., ABABEI, V., Med. int., **XV**, *2*, 153 – 159 (1963).
11. MUTING, D., Ztschr. inn. Med., **12**, 1107 (1957).
12. RIS, E. S., Anal. rom.sov., Seria medicină, **1**, 157–166 (1963).
13. SIEDE, W., *Virushepatitis und Folgezustände*, Leipzig. Joh. Ambrosius Barth, 1958.
14. SMELIK, P. G., Acta Endocrinologica, **33**, 437 (1060).
15. STRAUB, F. B., Biochemia, Budapesta, 346 (1961).
16. SZANTAI, I., URAY, Z., FĂRCĂȘANU, M., Simp. Radiobiol., Med. Nucl., Cluj, 1962.
17. SZANTAL, I., FĂRCĂȘANU, M., FODOR, O., COTUL, S., Rev. Internat. Hepat., **XIII**, *6*, 430–438 (1963).
18. VIGNEAUD Jdu. J. Biol. Chem., *65* , 1940 (1941).
19. VOLWILLER, W., GOLDSWORTHY P. D., Mc. MARTIN, M. P., WOOD. P.A., J. R. MACKAY, K. FREMONT SMITH, J. Biol., Chem., **209**, 1126 (1955).
20 WELLERS, G., Prod. pharmaceutiques, **15**, 307 (1960).

ST. CERC. BIOCHIM., 7, 3, 425 – 432 (1964)

STUDIUL COMPARATIV AL ANTIGENITĂȚII PROTEINELOR SOLUBILE DIN MITOCONDRIILE ȘI CITOPLASMA CREIERULUI DE ȘOBOLAN*

CECILIA ȘELARIU

576.8.097.2

Rezumat. — Electroforeza în gel de agar a proteinelor solubile mitocondriale (PSM) și citoplasmatice (PSC) a arătat o asemănare în mobilitatea electroforetică a fracțiunilor, cu o distribuție cantitativă diferită pentru fiecare din cele două proteine. Cercetările imunochimice au demonstrat identitatea dintre PSM și PSC. Prin întrebuințarea apei ca solvent de extracție a PSM, nu s-au obținut antigene specifice mitocondriale.

Formațiunile intracelulare au format obiectul unor cercetări imunologice încă din 1941 în vederea descoperirii unor antigene specifice țesuturilor tumorale. O dată cu introducerea metodelor de difuzie în gel, s-au reînceput cercetările asupra antigenității acestor formațiuni. S-a constatat atît complexitatea și specificitatea antigenelor proteice din fiecare formațiune intracelulară (mitocondrii, microzomi, citoplasmă solubilă), cît și existența unor antigene comune. Cercetările efectuate pe ficat [1—5] au fost extinse și la alte organe, în scopul sesizării unor antigene cu specificitate de organ [6], [7] sau de formațiune [8], [9]. Datorită conținutului lor bogat în acizi nucleici și prin participarea lor la sinteza proteinelor, microzomii sînt formațiunile cele mai studiate.

Într-o lucrare anterioară [10], am arătat existența unui fond proteic comun între mitocondriile ficatului și creierului de șobolan. Pentru aprofundarea datelor obținute și extinderea lor la studiul unor enzime, am crezut necesar să abordăm cercetarea acestor proteine din punct de vedere imunochimic. Literatura nu menționează date asupra antigenității formațiunilor intracelulare din creier, ci doar asupra antigenității proteinelor solubile totale extrase din creierul diferitelor animale [11], [12]. Ne-am oprit la mitocondrii și citoplasmă, deoarece identitatea dintre proteinele solubile ale acestor formațiuni semnalată în literatură (13) nu corespunde cu distribuția unor enzime similare funcțional dar deosebite cinetic. De aceia ne-am propus sa cercetăm comparativ proteinele solubile din mitocondrii (PSM) și din citoplasma liberă de formațiuni (PSC) ob-

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., 2, 1 (1965), în limba engleză.

ținute din creierul de șobolan. În acest sens am aplicat electroforeza în gel de agar și imunoelectroforeza. Metoda întrebuințată pentru extragerea PSM a fost aleasă în așa fel, încît aceasta să nu fie impurificată cu proteinele structurale ale mitocondriilor.

MATERIALE ȘI METODĂ

Prepararea antigenelor pentru imunizare și pentru imunoelectroforeză. S-au lucrat pe șobolani albi sacrificați prin decapitare. Creierii au fost scoși imediat, cîntăriți, spălați de sînge cu zaharoză 0,25 M rece și omogenizați cu 1 000 RPM pe min tot în zaharoză 0,25 M la 2°C. Raportul a fost de 9 părți zaharoză la 1 parte creier. S-au tăiat de obicei 14 șobolani (22—26 g creier). Toate operațiile și centrifugările s-au făcut la 2°C.

Proteinele solubile din mitocondrii (PSM). Metoda de separare a formațiunilor intracelulare a fost o combinație între metodele Brody și Bain, procedeul II [14], și Loevtrup și Zelander [15]. Omogenatul s-a centrifugat 10 min la 800 *g*, apoi s-a decantat. Supernatantul s-a centrifugat 10 min la 2 000 *g*, iar depozitul s-a îndepărtat. Supernatantul s-a centrifugat 10 min la 14 000 *g*. Mitocondriile depuse s-au spălat de trei ori prin reomogenizare cu cîte 10—15 ml zaharoză și s-au contrifugat 15 min la 10 000 *g*. Mitocondriile rămase de la ultima spălare s-au omogenizat cu 8—10 ml apă distilată și s-au înghețat pînă a doua zi la —15°C. S-au dezghețat și reînghețat de 3—4 ori în cursul zilei următoare, apoi s-au centrifugat 30 min la 14 000 *g*. Supernatantul foarte limpede s-a decantat cu o pipetă Pasteur și s-a liofilizat.

Proteinele solubile din citoplasmă (PSC). Supernatantul rămas de la depunerea mitocondriilor s-a centrifugat 50 min la 105 000 *g* (centrifuga VAC—40, H. Janetzky) pentru îndepărtarea microzomilor. Supernatantul limpede (jumătatea superioară) s-a concentrat prin ultrafiltrare (ultrafiltrul LKB) la aproximativ o treime, apoi s-a dializat contra apei distilate 48 de ore și s-a liofilizat. S-au întrebuințat antigene liofilizate, deoarece s-a constatat că dau aceleași rezultate ca și soluțiile proteice proaspete. De altfel, se arată [16] că formațiunile intracelulare din ficat, păstrate 9 luni la —20°C, nu-și modifică antigenitatea.

Prepararea antiserurilor. Antigenele liofilizate, reluate în ser fiziologic, s-au amestecat în părți egale cu gel de hidroxid de aluminiu (Institul Pasteur, București) și s-au injectat subcutant la iepuri. Imunizarea s-a făcut cu 120 mg proteină per animal, fracționată în 7—8 doze crescînde, la 4—5 zile interval : 3, 3, 12, 16, 24, 30 și 32 mg. Iepurii au fost sîngerați la 7—10 zile de la ultima injecție. Cu fiecare tip de antigen s-au injectat 3 iepuri. Titrul serurilor s-a determinat după metoda Uhlenhut [17]. Titrul precipitant a fost de 8,5 μg/ml antigen pentru PSM și 4—2 μg/ml antigen pentru PSC.

Analizele chimice și imunologice. Proteinele s-au determinat prin metoda Dzialosynski [18]. Concentrația proteică a preparatelor liofilizate a fost între 15 — și 30% pentru PSM și 25—60% pentru PSC, variind la fiecare șarjă. Cantitatea de antigen întrebuințată s-a calculat în funcție de rezultatele obținute la fiecare șarjă, în așa fel încît să existe constant o concentrație de 4% proteină în proba de antigen întrebuințată. Concentrația de 4% a fost stabilită în urma unor determinări prealabile.

Electroforeza în gel de agar și imunoelectroforeza s-au practicat după micrometoda Scheidegger [19], în tampon veronal-veronal sodic pH 8,6, concentrația tamponului fiind 0,05 M în cuvă și 0,017 M în plăci, și în tampon borat-fosfat [20], concentrația tamponului fiind 0,14 M acid boric în cuvă și 0,085 M în plăci. Potențialul 22,5 V/cm ; intensitatea 1 mA/cm ;

durata migrării 3 ore, la temperatura camerei. Prelucrarea plăcilor s-a făcut după metodele obişnuite, iar colorarea cu amidoschwarz.

Deoarece unele antigene tisulare dau linii de precipitare cu serul sanguin normal de iepure [21], am efectuat imunoelectroforeze de control, întrebuinţînd serul sanguin normal de iepure ca ser imun. Nu am obţinut nici o linie de precipitare.

Absorbţia antiserurilor. În acest scop s-a adăugat PSM la antiserul anti-PSC, respectiv PSC la antiserul anti-PSM, pînă la precipitarea totală (37°, 1 oră). Amestecul s-a ţinut apoi la frigider timp de 16 ore. Precipitatul s-a îndepărtat prin centrifugare la 5 000 t/min, 50 min, la 2°C.

REZULTATE

Electroforeza în gel de agar a proteinelor mitocondriale, citoplasmatice şi serice

Deoarece rezoluţia electroforetică optimă pentru proteinele mitocondriale şi citoplasmatice s-a obţinut în tamponul borat-fosfat de pH 7,6, am folosit acest tampon şi la electroforeza proteinelor serice. Separarea PSM a fost asemănătoare cu aceea de la electroforeza pe hîrtie în acelaşi tampon [10], delimitarea fracţiunilor fiind însă mai netă.

Electroforegramele sînt redate în figura 1. Repartizarea fracţiunilor electroforetice este asemănătoare la cele două proteine tisulare. PSM s-a separat în 13 fracţiuni repartizate în regiunea anodică (7 fracţiuni) şi în regiunea catodică (6 fracţiuni). PSC s-a separat în 11 fracţiuni, 7 repartizate în regiunea anodică şi 4 în regiunea catodică. Spre deosebire de PSM, cea mai mare cantitate de proteine este concentrată în regiunea anodică. Ambele proteine posedă două fracţiuni etalate la capătul anodic al plăcilor. avînd o viteză de migrare mare.

Electroforegramele PSC sînt foarte asemănătoare cu cele obţinute de alţi autori [11] [22] pentru proteinele totale salino-solubile din creier sau diferite regiune ale creierului. Din aceste rezultate la fel ca şi din cele obţinute de noi, se pot semnala, prezenţa fracţiunilor prealbuminice, repartizarea majorităţii fracţiunilor în regiunile corespunzătoare α şi β ale serului sangvin şi prezenţa în cantitate foarte mică a fracţiunilor proteice în regiunea corespunzătoare γ-globulinelor serice.

Comparînd electroforegramele obţinute cu PSM şi PSC ajungem la următoarele concluzii : PSM prezintă un grad de eterogenitate mai avansată decît PSC. Fracţiunile K şi J există în PSM şi nu există, sau se găsesc într-o cantitate nedetectabilă, în PSC (sub limita de sensibilitate a metodei electroforetice). Celelalte fracţiuni, care au o mobilitate electroforetică asemănătoare, sînt distribuite în cantităţi diferite în fiecare din cele două proteine.

Impurificarea cu ser sanguin a antigenelor

PSM obţinută de noi nu conţine impurităţi de ser sanguin, fapt demonstrat prin imunoelectroforeză. Serul imun anti-PSM nu reacţionează cu proteinele serice.

Dimpotrivă, PSC conține ser sanguin, deoarece spălarea de sînge a creierului nu este suficientă pentru îndepărtarea lui totală. De altfel, nici perfuzarea prelungită a creierului, practicată de Depieds și colab. [23], nu îndepărtează complet proteinele serice din creier. Această impurificare a PSC determină formarea de anticorpi și față de proteinele serice, atunci cînd se injectează iepurii cu porteina citoplasmatică. Se știe că impuritățile pot determina formarea de anticorpi în raport neproporțional cu cantitatea lor în complexul antigenic injectat [24].

Impurificarea PSC cu ser sanguin a fost net evidențiată prin imunoelectroforeză. Serul imun anti-PSC reacționează intens cu proteinele serice, obținîndu-se linii de precipitare pe toată zona de etalare a fracțiunilor electroforetice (fig. 2*a*).

Pentru a ne convinge că reacția obținută nu este cauzată de o eventuală înrudire imunochimică între PSC și proteinele serice, am efectuat următoarea experiență : am îndepărtat din serul imun anti-PSC anticoprii față de PSC, adăugînd PSM, care este înrudită imunochimic cu PSC. (Această înrudire reise din concluziile finale ale lucrării.) Antiserul absorbit va conține numai anticorpii față de serul sanguin. Imunoelectroforeza proteinelor serice executată cu antiserul absorbit evidențiază prezența acestor anticorpi (fig. 2 *b*).

Aceste rezultate sînt în concordanță cu datele lui Depieds și colab. [25], care au demonstrat că reacția proteinelor tisulare cu serul imun preparat față de proteinele serice ale aceluiași animal este provocată de urmele de sînge prezente în țesuturile folosite și nu este o reacție încrucișată. În consecință, am practicat întotdeauna absorbția serului anti-PSC cu ser sanguin, iar *rezultatele prezentate au fost obținute numai cu serurile imune anti-PSC absorbite în prealabil cu ser sanguin.*

Analiza imunoelectroforetică a proteinelor tisulare

Analiza imunoelectroforetică a PSM și PSC cu antiserurile omologe corespunzătoare este înfățișată în figura 3.

La perechea PSM-antiserul omolog (fig. 3 *a*) se constată apariția a 7 linii de precipitare, repartizate în zonele catodică și anodică ale plăcii, cele mai intense linii de precipitare (*I*, *IV*, *VI*) fiind corespunzătoare fracțiunilor electroforetice aflate în cantitate mare. Numărul liniilor de precipitare este inferior numărului fracțiunilor electroforetice. Acest fapt poate avea două explicații : 1. fracțiunile respective se găsesc în cantitate mică, au o antigenitate slabă și de aceea nu au provocat formarea anticorpilor la animalele imunizate. 2. Proteinele sînt dotate cu mobilități electroforetice diferite, însă au aceeași structură antigenică.

La perechea PSC-antiserul omolog (fig. 3 *b*) se constată apariția a 10 linii de precipitare, repartizate de asemenea în ambele zone ale plăcii. Spre deosebire de sistemul PSM-antiser omolog, PSC prezintă o linie intensă de precipitare (*VIII'*), corespunzătoare fracțiunilor electroforetice aflate în cantitate mică. Acest fapt dovedește că această fracțiune este puternic antigenică. În cazul PSC există o concordanță între numărul fracțiunilor electroforetice și numărul liniilor de precipitare.

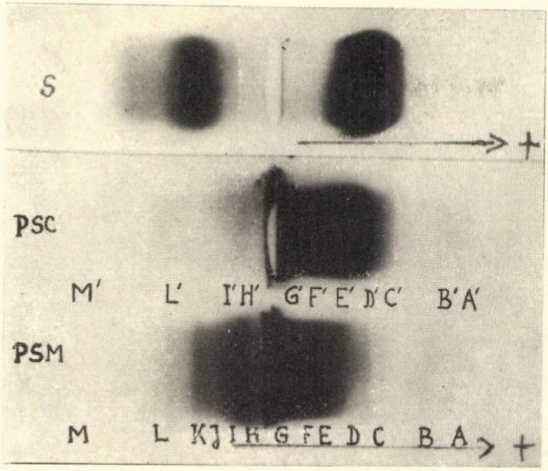


Fig. 1 Electroforeza în gel de agar;
s — ser sanguin
PSM — proteinele solubile mitocondriale
PSC — proteinele solubile citoplasmatice

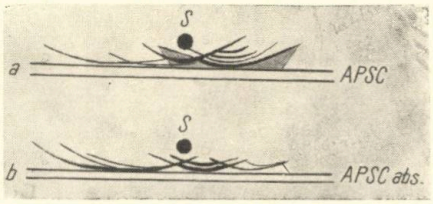


Fig. 2. Imunoelectroforeza serului sanguin;
APSC — ser imun anti-PSC
APSC abs. — ser imun anti-PSC absorbit cu PSM.

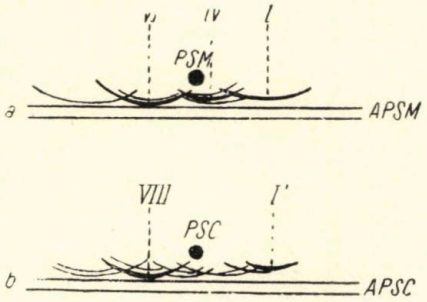


Fig. 3. Imunoelectroforeza proteinelor solubile mitocondriale şi citoplasmatice; (reacţii omoloage)

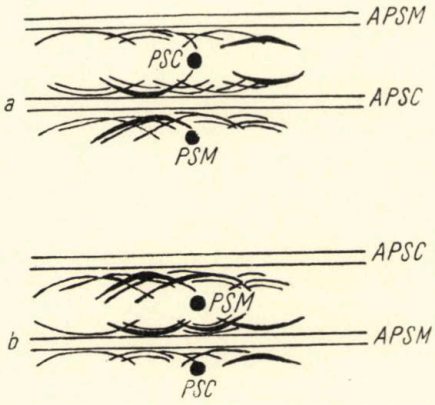


Fig. 4 Imuneoelectroforeza proteinelor solubile mitocondriale şi citoplasmatice; (reacţii omoloage şi heteroloage)

Înrudirea sau diferențierea între PSM și PSC am studiat-o executînd reacțiile încrucișate între PSM-serul imun anti-PSC și PSC-serul imun anti-PSM. Rezultatele imunoelectroforezei sînt date în figura 4.

Comparînd liniile de precipitare date de serul imun anti-PSC cu PSC și PSM (fig. 4 *a*), se constată că majoritatea liniilor de precipitare sînt asemănătoare prin poziția și forma lor. PSC conține în plus două linii de precipitare, ceea ce ar indica că PSC posedă un număr de două antigene caracteristice inexistente în PSM. Dar și în PSM sînt prezente antigene specifice care nu există în PSC. Acest lucru se observă din figura 4 *b*, în care sînt comparate liniile de precipitare date de serul imun anti-PSM cu PSC și PSM.

Pe baza acestor rezultate am presupus că cele două formațiuni au majoritatea antigenelor comune, distribuite însă în cantități inegale (vezi electroforeza pe agar, vezi intensitatea liniilor de precipitare *VI* la PSM și *VIII'* la PSC din regiunea catodică a imunoelectroforegramelor), și că fiecare au în plus un număr de antigene specifice.

Am încercat să verificăm aceste presupuneri efectuînd analiza imunoelectroforetică comparativă a PSC cu serurile imune anti-PSC și anti-PSM (fig. 4 *a*). Din figură se observă că reacția omologă prezintă un număr mai mare de linii de precipitare. Liniile de precipitare obținute între PSC și serul anti-PSM reprezintă fondul antigenic comun al acestor proteine tisulare. Această concluzie, în concordanță cu presupunerea existenței antigenelor specifice în aceste două formațiuni, nu este însă confirmată de analiza imunoelectroforetică comparativă a PSM efectuată cu antiserurile anti-PSC și anti-PSM (fig. 4 *b*). Comparînd numărul, poziția și forma liniilor de precipitare, se constată că reacția PSM cu serul imun anti-PSC este asemănătoare cu reacția omologă. Aceste rezultate par să arate că citoplasma conține toate antigenele prezente în PSM, avînd în plus un număr mic de antigene specifice.

Datorită acestor rezultate neconcordante, ne-am propus să analizăm diferențierea semnalată cu ajutorul serurilor absorbite pentru a elimina sursele de eroare cauzate de calitatea antiserurilor folosite, de existența unor fracțiuni proteice aflate în cantități foarte mici în proteinele tisulare, de complexitatea imunoelectroforegramelor care îngreuiază observația.

Analiza imunoelectroforetică cu antiseruri absorbite

Serul imun anti-PSC a fost absorbit cu PSM, iar serul imun anti-PSM a fost absorbit cu PSC.

În urma absorbției nu s-au mai obținut linii de precipitare nici la reacția omologă, nici la reacția eterologă.

Prin folosirea serului imun anti-PSM absorbit cu PSC, se confirmă datele care au arătat că PSM nu posedă antigene în plus față de PSC, iar întrebuințarea serului imun anti-PSC absorbit cu PSM, infirmă datele obținute cu seruri neabsorbite, care au arătat că PSC posedă două antigene în plus față de PSM.

Analiza imunoelectroforetică cu antiserurile absorbite dovedește că între PSM și PSC există o înrudire antigenică atît de pronunțată, încît cu antiserurile preparate de noi nu se pot pune în evidență antigene caracteristice fiecărei formațiuni.

DISCUȚII

Rezultatele noastre sînt în aparență contrare datelor [4], [5] care arată că mitocondriile hepatice conțin antigene specifice, pe lîngă un număr mic de antigene comune cu citoplasma. Aceste date sînt obținute însă prin întrebuințarea extractelor mitocondriale, solubile în dezoxicolat de sodiu, ca antigene, extracte care conțin un amestec eterogen de proteine. Antigenele specifice, în aceste condiții, sînt cele extrase cu dezoxicolatul de sodiu din lipoproteinele membranelor structurale ale mitocondriilor. Lucrînd numai cu proteinele acvosolubile intramitocondriale, noi îndepărtăm complet părțile structurale ale mitocondriilor, și în felul acesta nu obținem antigenele specifice.

Rezultatele noastre obținute prin întrebuințarea proteinelor acvosolubile vin în sprijinul afirmației lui Green (13) după care „spațiile interne dintre elementele structurale ale mitocondriilor sînt prelungiri ale citoplasmei".

În felul acesta, concluzia noastră este un argument pentru unitatea antigenică a proteinelor solubile din interiorul celulei, indiferent de repartiția lor între formațiuni.

Dar înrudirea antigenică constatată poate fi determinată de identitatea antigenelor sau numai de existența grupărilor determinante identice, care nu reprezintă însă decît o mică parte din molecula proteică. Amestecurile de antigene utilizate în această lucrare nu au permis să se stabilească care din cele două posibilități stă la baza înrudirii imunochimice. În principiu, este posibil ca o parte dintre antigene să posede doar anumite detalii de structură comune. În cazul PSM și PSC, această afirmație poate fi susținută de lucrările efectuate pe enzimele similare funcțional, distribuite atît în citoplasmă, cît și în mitocondrii. Aceste enzime deosebite ca comportare cinetică și diferențiate imunochimic sînt specifice de formațiune (transaminazele glutamic-oxalacetice [26], izo-citratdehidrogenazele [27]). Aceste date, contrare concluziilor noastre asupra strînsei înrudiri antigenice a celor două proteine tisulare, pot fi explicate prin faptul că fiecare enzimă se găsește în proteina solubilă în cantități foarte mici. În plus, ele posedă o antigenicitate slabă [27] și nu pot da naștere la anticorpi specifici sesizabili în condițiile noastre de lucru.

Prezența acestor cantități mici de enzime în proteinele studiate de noi nu contrazice afirmația unității antigenice dintre PSM și PSC, unitate care este în concordanță și cu lucrarea lui Depieds și colab. [28] asupra înrudirii antigenice mai frecvente între proteinele tisulare decît între acestea și serul sanguin.

Prezentată la redacție
la 24 iunie 1964

Institutul de biochimie al Academiei R.P.R.,
București

BIBLIOGRAFIE

1. P. PERLMANN, V. D'AMELIO, *Soluble antigens in microsomes and other cell-fractions of rat liver*, Nature, **181**, 491 (1958).
2. P. PERLMANN, T. HUTLIN, V. D'AMELIO, W. S. MORGAN, *Distribution and metabolism of protein antigens in rat liver*, Exp. Cell. Res., *supl.* **7**, 279 (1959).
3. V. D'AMELIO, P. PERLMANN, *The distribution of soluble antigens in cellular structures of rat liver.*, Exp., Cell. Res., **19**, 383 (1960).
4. V. MUTOLO, V. D'AMELIO *Antigen distribution in rat liver mitochondria*, Experientia, **18**, 556 (1962).
5. V. D'AMELIO, V. MUTOLO, A. BARBARINO, *Immunological and electrophoretic analysis or rat liver mitochondria and other cellular fractions*, Exp. Cell. Res., **29**, *1* (1963).
6. T. S. OKADA, A. G. SATO., *Soluble antigens in microsomes of adult and embrionic kiddneys.*, Exp. Cell. Res., **31**, 251 (1963).
7. P. VOGT, *Distribution of tissue-specific antigens in centrifugal fractions of rat liver*, Nature, **182**, 1807 (1958).
8. J. S. DAVIS, A. J. BOHET, *Effect of antibodies on mitochondria*, J, Clin, Invest., **41**, 2142 (1962).
9. G. UGAZIO, *Comportamento immunologico di alcune frazioni citoplasmatiche. V. Specificita antigene delle proteine solubili di fegato normale e steatosico di ratto*, Sper. Arch. Biol. Norm. e Patol., **112**, 267 (1962).
10. C. ŞELARIU, S. MIHĂESCU, *Cercetarea comparativă a proteinelor solubile din mitocondriile de creier şi ficat de şobolan*, St. cerc. biochim., **4**, *3*, 349 (1961).
11. C. CHATAGNON, P. CHATAGNON, *Etude des protéines cérébrales solubles de l'homme. IV. Electrophorèse en gelose et immunoélectrophorèse*, Ann. biol. clin., **18**, *4—7*, 427 (1960).
12. R. DEPIEDS, G. CARTOUZOU, D. GIGNOUX, *Sur les caractères immunochimiques des protéines solubles du tissu cérébral du lapin*, C. R. Soc. Biol., **155**, *10*, 1970 (1961).
13. D. E GREEN, *Structure and function of subcellular particles*, în *Plenary lecture at the V-th International Congress of Biochemistry*, Moscova, 1961.
14. T. M. BRODY, J. A. BAIN, *A mitochondrial preparation from mammalian brain*, J. Biol. Chem., **195**, 685 (1952).
15. S. LOEVTRUP., T. ZELANDER, *Isolation of brain mitochondria*, Exp. Cell. Res., **27**, 468 (1962).
16. KUO-YEN KU, WANG JU-DA, *Comparative studies on the antigens of three cytoplasmic fractions from the hepatoma and liver of rats. III. Agar-diffusion test with special reference to the purification of antigens*, Acta Biol. Exp. Sinica, **7**, 353 (1962).
17. E. R. GOLD, *Imunologie practică*, Edit. med., Bucureşti, 1957, 145.
18. L. M. DZIALOSYNSKI, *Colorimetric microdetermination of protein*, în *IV-th International congress of Biochemistry*, Viena, sec. 17—13, 199 (1958).
19. J. J. SCHEIDEGGER, *Une micro-méthode de l'immunoélectrophorèse*, Int. Arch. Allergy, **7**, 103 (1955).
20. V. GHETIE, *Mărirea capacităţii de rezoluţie electroforetică a tamponului borat prin adăugarea ionului fosfat*, St. cerc. biochim., **4**, *3*, 397 (1961).
21. R. ARDRY, A. COURTIN, *Recherches sur les anticorps antitissulaires. I. Mise en évidence de leur spécificité par mesure photométrique de la réaction de précipitation antigène-anticorps*, Ann. Biol. Clin., **19**, 49 (1961).
22. A. V. PALLADIN, N. M. POLIAKOVA, *Zastosuvania metodu elektroforezu na agar-agari dlia rozdilenia rozciinih bilkiv nervovoi tkanini*, Ukr. biohim. J., **31**, 307 (1959).

23. R. DEPIEDS, G. CARTOUZOU, H. GIGNOUX, C. CARTOUZOU, *Détermination de la contamination sanguine de différents organes de lapin préalablement lavé par perfusion. Etude électrophorétique de leur protéines solubles*, C.R. Soc. Biol., **156**, *8—9*, 1444 (1962).
24. M. RAYMOND, *Remarque sur la réaction protéine-antiprotéine*, Exp. Ann. Biochim. Med. **22**, 69 (1960).
25. R. DEPIEDS, G. CARTOUZOU, S. LISSITSKY, H. GIGNOUX, D. GIGNOUX., *Mise en evidence par la méthode immunoélectrophorétique de la contamination sérique de différents organes de lapin lavés par perfusion*, C. R. Soc. Biol., **156**, *8—9*, 1450 (1962).
26. YOSHIMASA MORINO, HIROYUKI KAGAMIYAMA, HIROSHI WADA, *Immunochemical distinction between glutamic-oxaloacetic transaminases from the soluble and mitocondrial fractions of mammalian tissues*, J. Biol. Chem., **239**, PC 943 (1964).
27. J. M. LÖWENSTEIN, S. R. SMITH, *Intra- and extramitochondrial isocitrate dehydrogenases*, Biochim. Biophys. Acta, **56**, 385 (1962).
28. R. DEPIEDS, G. BOEUF, C. CARTOUZOU, H. GIGNOUX, *Parentés immunochimiques entre certains antigènes tissulaires du lapin*, C.R. Soc. Biol., **156**, *11*, 1885 (1962).

ST. CERC. BIOCHIM., T. 3, 433 – 439 (1964)

AMINOACIZII LIBERI DIN CREIER ÎN FILOGENIE *

MIHAIL ŞERBAN

612.124 : 611—018.8

Rezumat. — Analiza compoziţiei creierului în aminoacizi liberi arată în filogenie existenţa unor asemănări, ceea ce reflectă unul din aspectele unităţii planului biochimic. Această unitate se evidenţiază atît prin prezenţa unor compuşi semnificativi în filogenia creierului, printre care în special acidul glutamic şi acidul γ-aminobutiric, cît şi prin valorile concentraţiei globale a aminoacizilor liberi din creier, care sînt destul de apropiate în filogenie. Aminoacizii liberi din creierul mai evoluat filogenetic manifestă o activitate polarografică specifică grupării tiol ; la animalele cu sînge rece această activitate este fie atenuată, fie modificată, probabil prin schimbarea raportului dintre cistină + cisteină şi glutation. Aminoacizii liberi din creier prezintă în filogenie o trăsătură generală comună, un fond comun, în cadrul căruia apar şi anumite particularităţi dependente de gradul de evoluţie filogenetică.

Pornind de la rezultatele şi concluziile unor lucrări anterioare de biochimie comparată a proteinelor cerebrale [1—4], ne-am propus să extindem cercetările noastre asupra unui domeniu conex, şi anume acela al aminoacizilor liberi din creier în filogenie.

Caracterizarea compoziţiei creierului în aminoacizi liberi în dependenţă de evoluţia filogenetică, ni s-a părut nu numai interesantă, dar şi necesar să fie urmărită, deoarece între proteinele cerebrale şi aminoacizii liberi din creier se admite că există anumite raporturi, care nu sînt însă suficient precizate. Specificitatea compoziţiei calitative şi cantitative a aminoacizilor liberi sau uşor extractibili din diferite ţesuturi poate fi considerată, într-o anumită măsură, ca o reflectare a activităţii metabolice a ţesutului respectiv [5].

MATERIAL ŞI METODE

S-a lucrat cu creierul integral, provenit de la unele specii animale situate pe diferite trepte de evoluţie filogenetică : bou, şobolan alb, porumbel, broască ţestoasă (*Emys orbicularis*), amfibie (*Rana ridibunda*), peşte (*Cyprinus carpio*). Creierul, scos imediat după decapitare, a fost spălat cu soluţie salină fiziologică (0,85 g % NaCl) răcită la +4°C. şi ulterior uscat pe hîrtie

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, 3 (1964), în limba franceză.

de filtru. Probe, conţinînd 4—8 creiere, s-au cîntărit şi apoi s-au triturat cu nisip de cuarţ, în prezenţa acidului tricloracetic, răcit în prealabil. Raportul de extracţie a fost de o parte (în greutate) ţesut şi cinci părţi (în volume) acid tricloracetic 20%. Omogenatul a fost lăsat 15 min la +4°C, după care s-a centrifugat la 2 500 *g*.

Purificarea probei (6 ml supernatant) care conţinea aminoacizii liberi s-a făcut prin trecerea printr-o coloană de Zeocarb 225 50—100 mesh (Serva) [6], [7], avînd 10 cm înălţime şi 1 cm diametru. Lichidul amoniacal folosit ca eluant pentru aminoacizii reţinuţi pe răşină a fost supus unei evaporări lente. Reziduul obţinut s-a reluat cantitativ cu 0,6 ml alcool izopropilic 10%, acidulat cu acid clorhidric. Aceasta a reprezentat proba care a fost destinată : *a*) analizei cromatografice, *b*) determinării cantitative globale a aminoac zilor liberi şi *c*) analizei polarografice a acestor aminoacizi.

Analiza cromatografică s-a efectuat în sistem monodimensional descendent, folosind completul cromatografic tip Kropa. Probele s-au aplicat pe hîrtie Whatman nr. 1, în spoturi de cîte 20 µl fiecare, irigarea făcîndu-se în sistemul butanol-acid acetic-apă 11 :3 :11. După două irigări succesive în aceleaşi condiţii, cromatogramele au fost developate cu o soluţie 0,2% de ninhidrină în butanol. Paralel a fost efectuată în condiţii identice şi cromatografia unor amestecuri de aminoacizi „martori", după metoda standardului extern. Soluţiile acestor aminoacizi, de concentraţie 10^{-2} M, au fost făcute în alcool izopropilic 10%, acidulat cu acid clorhidric (cu excepţia soluţiei de triptofan). Probele conţinînd diferite amestecuri de aminoacizi „martori" au parcurs aceleaşi etape de prelucrare în vederea cromatografierii lor : trecere prin coloană cu schimbători de ioni, eluţie, evaporare la sec, reluare şi cromatografiere în condiţiile menţionate. Pentru punerea în evidenţă a unor aminoacizi s-au efectuat cîteva reacţii specifice [8]. Astfel, prolina şi oxiprolina s-au evidenţiat prin reacţia cu isatină, histidina prin reacţia Pauly, serina şi treonina cu reactivul Nessler, tirozina cu o-nitrozo-β-naftol, arginina cu 8-oxichinolină.

Determinarea cantitativă a aminoacizilor liberi din creier s-a făcut, în principiu, după micrometoda Moore şi Stein [9]. Extincţia s-a măsurat la fotometrul Pulfrich, $\lambda = 570$ mµ, $d = 1$ cm. Valorile citite (din care s-a scăzut extincţia probei martor obţinute în aceleaşi condiţii) au fost interpolate pe o curbă etalon realizată cu o soluţie standard de leucină 10^{-2} g%.

În vederea obţinerii anumitor date suplimentare asupra compoziţiei în aminoacizi liberi din creier, o altă parte din proba trecută prin coloană, evaporată şi reluată, a fost supusă analizei polarografice. Aceasta s-a efectuat în mediu cobalto-amoniacal : la soluţia de bază, compusă din 2 ml $CoCl_2$ 4.10^{-3} N, 0,5 ml NH_4Cl 1 N şi 0,5 ml NH_4OH 1 N [10], s-a adăugat 0,1 ml din proba conţinînd aminoacizii liberi din creier. Condiţii de polarografiere : tensiunea 3,8 V, sensibilitatea galvanometrului 1/70, temperatura 24—25°C, timpul de picurare 2,8 s. Pentru testarea polarografică a proporţiei tioaminoacizilor, s-a recurs la reacţia de inhibare cu o soluţie de acid monoiodacetic 5.10^{-2} M. Determinări cantitative absolute nu au fost posibile, dat fiind faptul că nu toţi aminoacizii sînt polarografic activi în acelaşi mediu şi, în general, nu dau acelaşi tip de unde polarografice. Cu toate acestea, aplicarea polarografiei în condiţiile noastre s-a dovedit utilă, prin furnizarea unor date privind caracterizarea compoziţiei aminoacizilor liberi în funcţie de evoluţia filogenetică a creierului.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Datele obţinute cu privire la compoziţia în aminoacizi liberi * a creierului în filogenie au fost grupate, pe baza prezenţei şi intensităţii de culoare a diferitelor spoturi, în următoarele trei categorii : *a*) amino-

* Prin această denumire vom desemna compuşii ninhidrinopozitivi în ansamblu. În paranteze, aminoacizii a căror prezenţă nu a fost semnalată în toate cromatogramele efectuate.

acizi liberi identificați; *b*) aminoacizi semnificativi; *c*) aminoacizi urme.

Creier de mamifer: *a*) cistină + cisteină, lizină (histidină), arginină, glutamină, acid aspartic, serină, glicocol, acid glutamic, alanină, valină, fenilalanină, leucină + izoleucină, glutation, acid γ-aminobutiric (taurină);

b) acid glutamic, acid γ-aminobutilic (alanină);

c) (prolină), valină, fenilalanină (tirozină), glutation (taurină).

Creier de pasăre: *a*) cistină + cisteină, lizină, histidină, arginină glutamină, acid aspartic, serină, glicocol, acid glutamic, alanină, prolină, valină, fenilalanină, leucină + izoleucină, glutation, acid γ-aminobutiric (taurină);

b) acid glutamic, acid γ-aminobutiric;

c) prolină, valină, fenilalanină (tirozină) (taurină);

Creier de reptilă: *a*) cistină + cisteină, lizină, histidină, arginină (glutamină), acid aspartic, serină, glicocol, acid glutamic, alanină (prolină) (fenilalanină) (leucină + izoleucină), glutation, acid γ-aminobutiric;

b) acid glutamic, acid γ-aminobutiric;

c) prolină (tirozină), fenilalanină, leucină + izoleucină.

Creier de amfibie: *a*) cistină + cisteină, lizină, histidină, arginină, glutamină, acid aspartic, serină, glicocol, acid glutamic, alanină (prolină), (valină), fenilalanină, leucină + izoleucină, glutation, acid γ-aminobutiric (taurină);

b) acid glutamic, acid γ - aminobutiric;

c) fenilalanină, leucină + izoleucină.

Creier de pește: *a*) cistină + cisteină, lizină, histidină, arginină, glutamină, acid aspartic, serină, glicocol, acid glutamic, alanină, prolină, tirozină, metionină, valină, fenilalanină, leucină + izoleucină, glutation, acid γ-aminobutiric;

b) acid glutamic, alanină, glutation.

Din datele menționate (fig. 1, 2 și 3) rezultă ca o primă caracteristică faptul că spectrul cromatografic al aminoacizilor liberi din creier prezintă în filogenie o trăsătură în general comună, care, în linii mari, se evidențiază printr-o compoziție asemănătoare atît ca tipuri, cît și ca număr de aminoacizi. Acest fapt atestă semnificația metabolică pe care trebuie s-o aibă aminoacizii liberi din creier, cunoscută fiind astăzi intensitatea procesului de reînnoire a proteinelor cerebrale și participarea aminoacizilor liberi la acest proces. (Menționăm că rezultatele noastre concordă cu cele semnalate de unii autori, care au urmărit prin cromatografie pe hîrtie aminoacizii liberi, în special din creierul diferitelor mamifere [11], [12], precum și, în general, cu unele date obținute recent prin cromatografia pe schimbători de ioni [13] a aminoacizilor liberi din creierul diferitelor vertebrate.)

O altă caracteristică a aminoacizilor liberi în filogenia creierului o constituie prezența grupului de aminoacizi semnificativi: acidul glutamic, în special, și acidul γ-aminobutiric. Aceasta evidențiază un alt aspect al

unității planului biochimic al țesutului cerebral în filogenie. De altfel, este cunoscut din literatură [12] că acidul glutamic se află în creierul de mamifer în concentrație mare, fiind unul dintre metaboliții esențiali ai țesutului cerebral, că acidul γ-aminobutiric reprezintă un biocomponent de mare importanță biologică și funcțională pentru acest țesut și că între acești doi aminoacizi există relații biochimice directe. Menționăm că în grupul aminoacizilor liberi semnificativi din creierul de pește se încadrează, prin concentrația sa ridicată, și alanina; în schimb, acidul γ-aminobutiric este mai puțin semnificativ decît în toate celelalte cazuri. Aceste cîteva particularități par explicabile, întrucît creierul de pește este situat morfologic și funcțional la cel mai inferior nivel de evoluție filogenetică și considerăm că ele nu constituie, totuși, o abatere esențială de la aspectele comune, caracteristice aminoacizilor liberi din creier în filogenie. Din analiza cromatografică reiese că în creierul animalelor cu sînge rece glutationul apare sub forma unui spot mai individualizat și mai intens decît în cazul creierului de mamifer și de pasăre.

Referitor la aminoacizii liberi din creier, care apar ca urme în spectrul cromatografic, deși nu se poate evidenția o regulă generală în filogenie, se constată, totuși, pentru majoritatea cazurilor un conținut scăzut al valinei, fenilalaninei, leucinei + izoleucinei, prolinei și taurinei.

Tabela nr. 1

Valorile concentrațiilor globale ale aminoacizilor liberi din creier în filogenie (g % țesut umed)

Aminoacizii liberi din	Valori medii	Valori extreme
Creier mamifer (bou)	0,35	0,34—0,36
Creier mamifer (șobolan)	0,30	0,28—0,32
Creier pasăre	0,33	0,30—0,39
Creier reptilă	0,33	0,32—0,34
Creier amfibie	0,23	0,21—0,25
Creier pește	0,33	0,31—0,35

Un alt aspect care completează trăsătura generală de unitate și care caracterizează aminoacizii liberi din creier în filogenie îl constituie valorile concentrației lor globale, care sînt destul de apropiate. În tabela nr. 1 sînt prezentate valorile concentrației globale a aminoacizilor liberi din creierul unor specii animale deosebite filogenetic (valorile sînt exprimate în g aminoacizi liberi — ca leucină — la 100 g țesut umed și reprezintă media a 3—4 determinări). După cum se constată din această tabelă, nu se remarcă diferențe sistematice în concentrațiile globale ale aminoacizilor liberi în funcție de evoluția filogenetică a creierului, ci, din contră, valori destul de apropiate ale acestor concentrații, deși raporturile cantitative între unii aminoacizi pot varia de la o treaptă filogenetică la alta. La creierul de amfibie se constată o valoare ceva mai scăzută a concentrației în aminoacizi liberi, însă considerăm că diferența respectivă nu infirmă remarca generală cu privire la valorile asemănătoare ale concentrației aminoacizilor liberi din creier în filogenie.

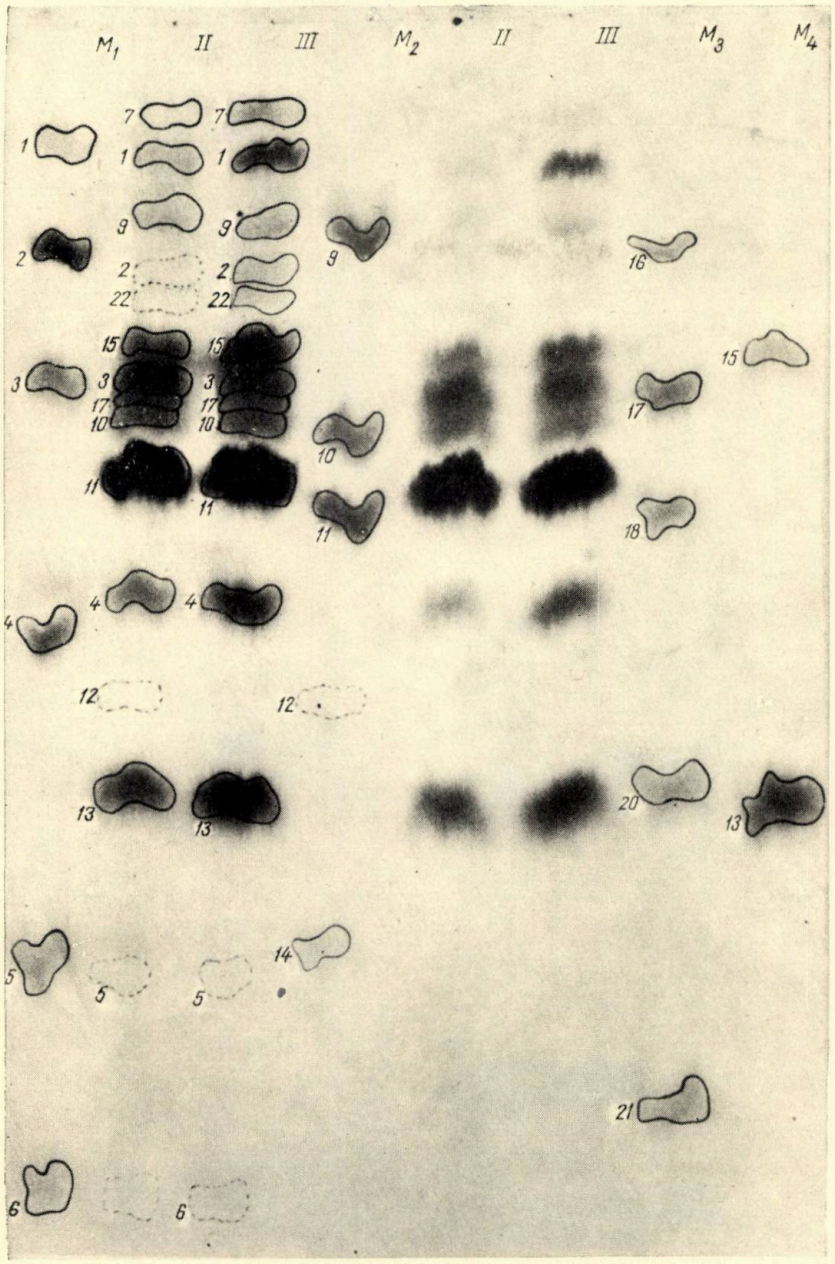


Fig. 1. — Cromatograma aminoacizilor liberi din creier de şobolan (*II*) şi creier de porumbel (*III*).

M_1 — aminoacizi standard : *1* — cistină, *2* — arginină, *3* — acid aspartic, *4* — alanină, *5* — valină, *6* — leucină ;

M_2 — aminoacizi standard : *9* — lizină, *10* — glicocol, *11* — acid glutamic, *12* — prolină, *14* — metionină ;

M_3 — aminoacizi standard : *16* — histidină, *17* — serină, *18* — treonină, *20* — tirozină, *21* — fenilalanină ;

M_4 — aminoacizi standard : *15* — glutamină, *13* — acid γ-aminobutiric, *7* — glutation, *22* — taurină.

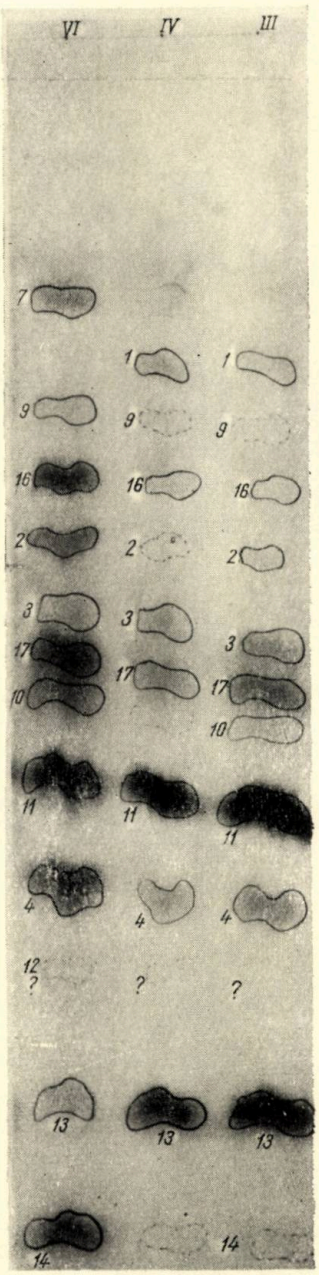


Fig. 2. — Cromatograma aminoacizilor liberi din creier de peşte (*VI*), creier de reptilă (*IV*) şi creier de porumbel (*III*):

11 — acid glutamic, *13* — acid γ-aminobutiric, *4* — alanină, *7* — glutation; partea finală a cromatogramei nu a fost cuprinsă în această fotografie.

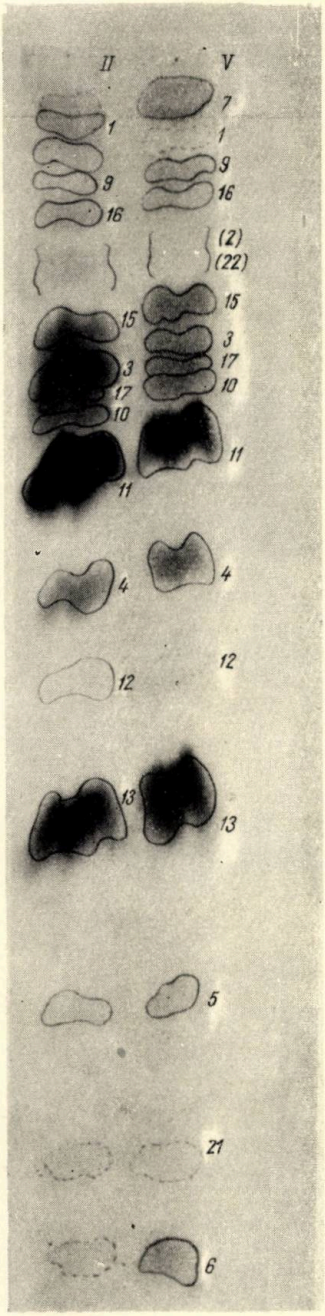


Fig. 3. — Cromatograma aminoacizilor liberi din creier de şobolan (*II*) şi creier de amfibie (*V*):

11 — acid glutamic, *13* — acid γ-aminobutiric, *7* — glutation, *22* — taurină.

Rezultă astfel că aminoacizii liberi din creier se caracterizează în filogenie (cel puțin pentru cazurile investigate) printr-o serie de aspecte generale comune, în ce privește nu numai compoziția lor calitativă, ci și cea cantitativă.

Cercetările noastre au comportat și unele determinări polarografice, efectuate pentru caracterizarea pe plan filogenetic a ansamblului de aminoacizi liberi din creier din punctul de vedere al prezenței și conținutului în grupări tiolice și disulfidice polarografic active. Astfel, din figura 4, în care sînt reprezentate undele polarografice ale aminoacizilor liberi din creierul diferitelor specii animale, se constată activitate polarografică în toate aceste cazuri; totodată se constată că există și anumite diferențe cu privire la comportarea polarografică în mediu cobalto-amoniacal a ansamblului de aminoacizi liberi, în funcție de evoluția filogenetică. Aceste diferențe se referă la forma, respectiv la caracteristicile undelor polarografice. Din acest punct de vedere, se pot distinge două aspecte: în cazul aminoacizilor liberi din creierul mai evoluat filogenetic (mamifer, pasăre), unda polarografică prezintă aspectul clasic dat de reacția catalitică a tioaminoacizilor cu maximul specific la — 1,6 V; în cazul aminoacizilor liberi din creierul animalelor cu sînge rece, undele polarografice prezintă unele deosebiri în raport cu unda pe care o dau tioaminoacizii în mediu cobalto-amoniacal. În acest din urmă caz, se observă tendința formării unei pretrepte între treapta de reducere a cobaltului și maximul caracteristic al grupării tiol, precum și tendința de abolire a acestui maxim. Desigur, în condițiile noastre experimentale, activitatea polarografică, respectiv natura și aspectul undei polarografice, sînt determinate de prezența grupărilor tiolice (disulfidice), iar modificările acestei unde, respectiv valoarea curentului catalitic, sînt determinate de prezența unora dintre compușii existenți în amestec. Dintre aceștia, compusul principal care induce modificările undei polarografice în cazurile menționate pare să fie glutationul. Această aserțiune se sprijină pe o serie de determinări polarografice efectuate cu diferite soluții de aminoacizi sau amestecuri de aminoacizi, în scopul precizării influenței pe care aceștia o pot avea asupra undei polarografice a tioaminoacizilor. Au fost astfel testați separat aminoacizii cistină, histidină, metionină, lizină, precum și gluta-

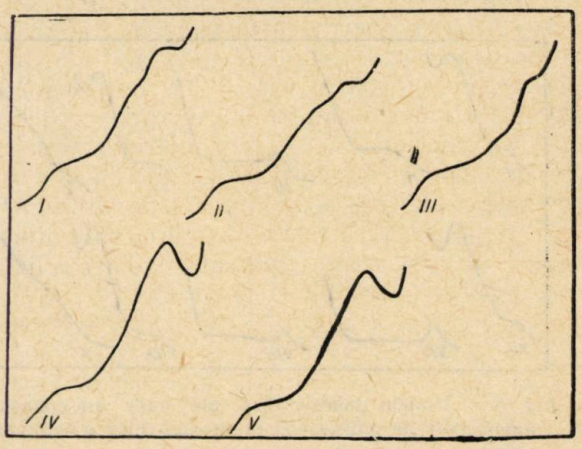


Fig. 4. — Undele polarografice ale aminoacizilor liberi din: *I* — creier de pește; *II* — creier de broască; *III* — creier de broască țestoasă; *IV* — creier de porumbel; *V* — creier de șobolan.

tionul, și de asemenea amestecurile de aminoacizi *A* (cistină, arginină, acid aspartic, alanină, valină, leucină), *B* (lizină, glicocol, acid glutamic, prolină, acid γ-aminobutiric, metionină) și *C* (histidină, serină, treonină, oxiprolină, tirozină, fenilalanină).

După cum rezultă din figura 5, cistina (*I*) prezintă unda caracteristică grupării tiol (electroreducere prealabilă), histidina (*II*) produce un mic maxim (la un potențial mai puțin negativ decît maximul cisteinei), metionina (*III*) este inactivă polarografic, dar în prezența cistinei (*IV*) se produce unda specifică ultimei, glutationul (*V*) singur sau în prezența cistinei este activ polarografic, producînd însă o undă nedefinită, respectiv o undă modificată a cistinei cu care interferează (tendință de pretreaptă și de abolire a maximului catalitic). Amestecul *A* de aminoacizi (*VI*) care conține cistină este polarografic activ, producînd unda catalitică specifică tioaminoacizilor; amestecurile *B* (*VII*) și *C* (*VIII*) de aminoacizi, care nu conțin nici cistină, nici glutation, sînt polarografic inactive. Dacă însă la amestecurile *B* sau *C* de aminoacizi se adaugă urme de cistină, se constată apariția efectului catalitic specific grupării tiol (*IX*). Adăugarea de glutation la amestecurile *B* sau *C* de aminoacizi produce de asemenea un efect polarografic notabil (*X*), însă unda respectivă prezintă o anumită abatere de la aspectul clasic al undei polarografice a cistinei (cisteinei).

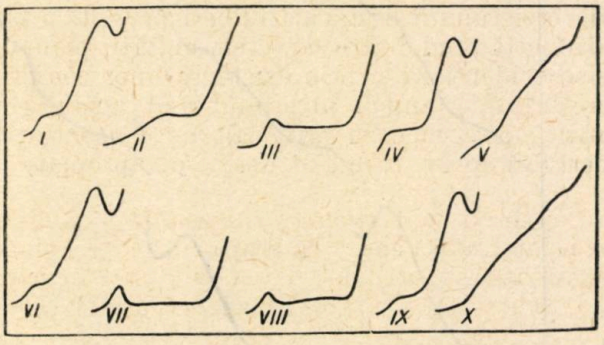


Fig. 5. — Undele polarografice ale unor aminoacizi sau amestecuri de aminoacizi în mediul cobal.o-amoniacal.

I — cistină; *II* — histidină; *III* — metionină; *IV* — metionină + cistină; *V* — glutation; *VI* — amestec *A*; *VII* — amestec *B*; *VIII* — amestec *C*; *IX* — amestec *C* + cistină; *X* — amestec *C* + glutation.

Din datele furnizate de aceste determinări rezultă că glutationul intervine în modificarea parametrilor undei catalitice a tioaminoacizilor, modificare constatată în cazul polarografierii amestecului de aminoacizi liberi din creierul animalelor cu sînge rece. Reiese implicit, așa cum pare să indice și analiza cromatografică, că conținutul glutationului este mai mare în creierul acestor animale sau că raportul dintre acest conținut și cel al cisteinei + cistinei este mai mare. În schimb, polarografia aminoacizilor liberi din creierul mai evoluat filogenetic (mamifer, pasăre) indică o undă catalitică specifică cistinei + cisteinei, asupra căreia glutationul nu are o influență marcantă. Aceste constatări rămîn însă să fie confirmate printr-o serie de determinări cantitative.

Prin reacția de diferențiere a cistinei și cisteinei în prezența acidului monoiodacetic s-a constatat că activitatea polarografică este determinată aproape exclusiv de cistină; inhibarea prealabilă a grupării tiol produce o

scădere destul de mică (aproximativ 10%) a valorii curentului catalitic obținut în prezența celor doi tioaminoacizi, ceea ce dovedește că concentrația cistinei ca aminoacid liber este superioară celei a cisteinei.

CONCLUZII

În general, compoziția creierului în aminoacizi liberi prezintă o asemănare în filogenie, ceea ce reflectă unul dintre aspectele unității planului biochimic. Această unitate se evidențiază și prin existența unor compuși semnificativi în filogenia creierului, și anume în primul rînd acidul glutamic și acidul γ-aminobutiric; de asemenea prin valorile concentrației globale a aminoacizilor liberi din creier, care sînt destul de apropiate în filogenie.

Aminoacizii liberi din creierul mai evoluat filogenetic (mamifer, pasăre) prezintă o activitate polarografică specifică grupării tiol; la animalele cu sînge rece, această activitate este atenuată sau modificată, se pare, de schimbarea raportului dintre cistină + cisteină și glutation.

Aminoacizii liberi din creier prezintă în filogenie o trăsătură generală comună, un fond comun, în cadrul căruia apar și anumite particularități dependente de gradul de evoluție filogenetică a creierului.

Prezentat la redacție
la 21 iunie 1964

Institutul de biochimie al
Academiei R.P.R., București

BIBLIOGRAFIE

1. M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., *3*, 309 (1959).
2. M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., *1*, 103 (1961).
3. M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., *3*, 383 (1963).
4. M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., *2,267* (1964).
5. E. ROBERTS, D. SIMONSEN, în *Amino Acids, Proteins and Cancer Biochemistry*, Acad. Press, 1960, 125.
6. E. R. COOK, M. LUSCOMBE, J. Chromat., **3**, 75 (1960).
7. I. SMITH, *Chromatographic and Electrophoretic Techniques*, **I**. Int. Publ., 1962, 55.
8. I. HAIS, K. MACEK, *Cromatografia*, Edit. Tehnică, București, 1960, 420 și 744.
9. S. MOORE, W. STEIN, J. Biol. Chem., **211**, 907 (1954).
10. M. ȘERBAN, St. cerc. biochim., *4*, 369 (1958).
11. E. ROBERTS, S. FRANKEL, P. HARMAN, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **74**, 383 (1950).
12. G. ANSELL, D. RICHTER, Biochem. J., **57**, 70 (1954).
13. M. OKUMURA, S. OTSUKI, T. AOYAMA, J. Biochem. (Tokio), **46**, 207 (1959).

ST. CERC. BIOCHIM., 7 3, 441 – 452 (1964)

STUDIU CITOCHIMIC ŞI CITOSPECTROFOTOMETRIC PE SERIA ALBĂ A ŞOBOLANILOR IRADIAŢI INTERN CU ^{32}P

II. UTILIZAREA ACIDULUI ASCORBIC CA RADIOPROTECTOR *

GRIGORE TURCU, VASILE VASILESCU, CONSTANTIN DIMOFTACHE şi PETRE WEXLER

616.155.3—092.9

Rezumat. — Se urmăresc modificări enzimatice şi nucleare la nivelul seriei albe a şobolanilor iradiaţi intern cu ^{32}P, cărora li s-a administrat în dietă acid ascorbic. Determinîndu-se la aceste animale dinamica scăderii şi refacerii leucocitare, dinamica scăderii şi refacerii limfocitelor şi neutrofilelor, nivelul fosfatazei alcaline leucocitare, modificările citospectrofotometrice ale nucleului limfocitar, se trage concluzia că pentru obţinerea unui efect radioprotector semnificativ trebuie folosite complexe de substanţe radioprotectoare. Acidul ascorbic realizează o oarecare radioprotecţie diferenţială. Ea se observă în special la nivelul neutrofilelor.

Problema radioprotecţiei chimice prezintă o importanţă deosebită atît din punct de vedere practic cît şi din punct de vedere teoretic. Practic, trebuie găsite substanţe chimice care, administrate organismului, să-i confere o radiorezistenţă crescută ; teoretic, trebuie rezolvată relaţia care există între structura chimică a substanţei protectoare şi gradul de protecţie oferit, pentru a putea înţelege mecanismul radioprotecţiei. Literatura ne oferă în această direcţie foarte mult material [1—11]. S-au făcut nenumărate experienţe cu substanţe radioprotectoare, atît *in vitro* cît şi *in vivo*, fapt care a permis să se tragă concluzia că acestea oferă radioprotecţie dacă sînt administrate înainte de iradiere. Din păcate însă nu s-a putut trage nici o concluzie asupra legăturii dintre structura substanţei chimice şi gradul de radioprotecţie, datorită faptului că substanţe cu structuri foarte variate realizează aceeaşi protecţie. Există nenumărate ipoteze care încearcă să explice mecanismul radioprotecţiei, însă toate sînt unilaterale şi, în consecinţă, nesatisfăcătoare [1].

Constatarea experimentală că radioprotectorii chimici au eficacitate numai dacă sînt administraţi înainte de iradiere ridică serioase probleme atunci cînd vrem să folosim aceste substanţe pentru radioprotecţie în iradierea internă. Într-adevăr, substanţele protectoare cunoscute pînă în prezent se caracterizează printr-o perioadă relativ scurtă (2—3 ore) de

* Lucrare publicată în Rev. roum. Biochim., **1**, 3 (1964), în limba franceză.

eliminare din organism, după ce au fost administrate. Prin urmare, în cazul iradierii interne cu surse care au timpul efectiv suficient de lung (în orice caz de ordinul zilelor), chiar dacă s-ar administra radioprotectori înainte de iradiere, ei s-ar elimina în următoarele 2 —3 ore, ceea ce face ca restul iradierii să se efectueze în absenţa radioprotectorilor. În afară de aceasta, aproape toţi chimioprotectorii cunoscuţi contribuie la o accelerare a eliminării izotopului din organism. În felul acesta s-ar realiza o radioprotecţie nu prin mecanisme intime biologice, ci ea ar fi rezultatul îndepărtării din organism a sursei radioactive [12 —15]. Nu am găsit în literatură lucrări care să comunice rezultate pozitive obţinute cu radioprotectori chimici în iradierea internă. Găsirea şi folosirea acestora sînt însă imperios necesare, în special pentru explorările clinice cu izotopi radioactivi.

Pornind de la acest imperativ de ordin practic, ne-am propus ca, o dată cu sursa de iradiere, să administrăm la un lot experimental de şobolani o substanţă chimică care ar oferi o eventuală radioprotecţie, fără a fi însă toxică. Am ales în acest scop acidul ascorbic [16 —25], din trei motive :

— rolul important pe care acidul ascorbic îl deţine în procesele de oxidoreducere din organism ;

— scăderea acidului ascorbic în principalele organe (în special cele radiosensibile) şi în sînge, în timpul iradierii [23], [24], [27] ;

— stimularea de către acidul ascorbic, atît *in vivo* cît şi *in vitro*, a sintezei acizilor nucleici [26].

MATERIAL ŞI METODE

Am efectuat lucrarea pe un lot de 20 de şobolani tineri (6 —8 luni), masculi, de rasă Wistar. S-au determinat la aceştia, în ziua începerii experienţei, următorii parametri :

1. Numărul de leucocite.

2. Formula leucocitară.

3. Procentul de granulocite în funcţie de nivelul fosfatazei alcaline. Am utilizat în acest scop metoda citochimică a lui Gömöri, modificată de Leonard, Izraels, Wilkinson (citat de [28]). Metoda ne-a permis diferenţierea granulocitelor în trei categorii, după nivelul activităţii fosfatazei :

— granulocite de gradul 0, fără activitate fosfatazică ;
— „ „ I, cu activitate fosfatazică medie ;
— „ „ II, cu activitate fosfatazică maximă.

4. Curbele citospectrofotometrice ale nucleului limfocitar. Curbele s-au trasat cu ajutorul unui citospectrofotometru construit în laboratorul nostru [29].

După determinarea acestor parametri [30], am împărţit animalele în patru loturi egale : A, B, C şi D. Şobolanii din loturile A şi C au fost injectaţi cu 1 μC/g soluţie izotonică $^{32}PO_4HNa_2$, iar loturile B şi C cu cîte 2 μC/g. Loturile A şi B au primit o dietă normală. Loturile C şi D au primit în dietă acid ascorbic (100 mg/şobolan/zi). Am determinat apoi la toate animalele parametrii arătaţi mai sus, în zilele 1,3, 6, 9, 12, 15 şi 20. Ultima zi a fost astfel aleasă, încît să corespundă cu durata medie efectivă de iradiere a ^{32}P. Recoltările au făcut întotdeauna la ora 8 dimineaţa.

REZULTATE ŞI DISCUŢII

Rezultatele experimentale şi discutarea lor trebuie privite şi interpretate ţinînd seama, în primul rînd, de particularităţile iradierii interne realizate cu sursa noastră, şi anume de durata medie efectivă de iradiere a ^{32}P, de doza primită de organism pe toată durata experimentării, de tipul de dezintegrare al sursei şi de energia emisă, de tipul de repartizare a izotopului în organism.

În figura 1 am reprezentat, într-un sistem de axe, dinamica scăderii şi refacerii leucocitelor celor 4 loturi de şobolani. Se observă că există o deosebire evidentă între curba scăderii şi refacerii leucocitare a lotului A şi aceea a lotului B. În cazul lotului A, în primele 3 zile de iradiere internă leucocitele din circulaţie nu prezintă o scădere importantă. Scăderea lor se remarcă în ziua a 6-a, pentru a atinge un maxim în ziua a 12-a. Urmează apoi o refacere leucocitară, care în ziua a 20-a atinge 83% din valoarea iniţială. În cazul lotului B, scăderea numărului de leucocite este importantă din prima zi după administrarea sursei. Ea atinge o valoare maximă între zilele 3 şi 12, după care începe refacerea leucocitară, în ziua a 20-a atingînd numai 51% din valoarea iniţială.

Nu acelaşi lucru îl putem spune despre dinamica scăderii şi refacerii leucocitare a loturilor de şobolani care au primit vitamină C în dietă. Într-adevăr, urmărind curbele de-a lungul celor 20 de zile, nu mai observăm o scădere pentru lotul D faţă de lotul C ca de la simplu la dublu, iar în ultima zi a experienţei diferenţele între loturile care au primit vitamina C şi cele care nu au primit-o sînt mici.

În figura 2 am reprezentat dinamica scăderii şi refacerii limfocitare, pe de o parte pentru că am luat în consideraţie radiosensibilitatea diferită a elementelor figurate din seria albă, iar pe de altă parte pentru a vedea sensibilitatea acestor elemente în funcţie de tipul de repartizare a ^{32}P în organism. Se ştie că distribuţia ^{32}P în organism este de tip scheletal, respectiv în primele zile el se găseşte diseminat în întregul organism, pentru ca începînd din ziua a 6-a să fie concentrat în special la nivelul scheletului [34]. Se observă din figura 2 că, datorită diseminării relativ uniforme a ^{32}P în organism în primele 3 zile — şi înţelegem prin aceasta prezenţa lui şi în sistemul limfopoietic —, limfocitele scad la toate loturile încă din prima zi. Pentru loturile A şi B scăderea este în concordanţă cu doza, lucru care nu se mai observă la loturile C şi D, care au primit în alimentaţie acid ascorbic. La sfîrşitul duratei medii efective de iradiere, aceste elemente rămîn scăzute, datorită radiosensibilităţii lor crescute.

Din figura 3 se observă că nu acelaşi aspect îl are graficul pentru neutrofile. În primele 3 zile, cînd izotopul se găseşte concentrat în schelet în cantitate mică, procentul de elemente de origine mieloidă este crescut atît pentru lotul A cît şi, mai ales, pentru lotul C, ca şi cum doza mică de iradiere ar stimula granulopoieza. Nu acelaşi lucru se observă în cazul loturilor B şi D, la care, administrîndu-se o doză dublă de izotop, acesta se concentrează suficient de mult în schelet încă din prima zi, pentru ca neutrofilele să scadă brusc. Este interesant de observat că, în timp ce la limfocite acidul ascorbic nu determină o modificare importantă, în cazul

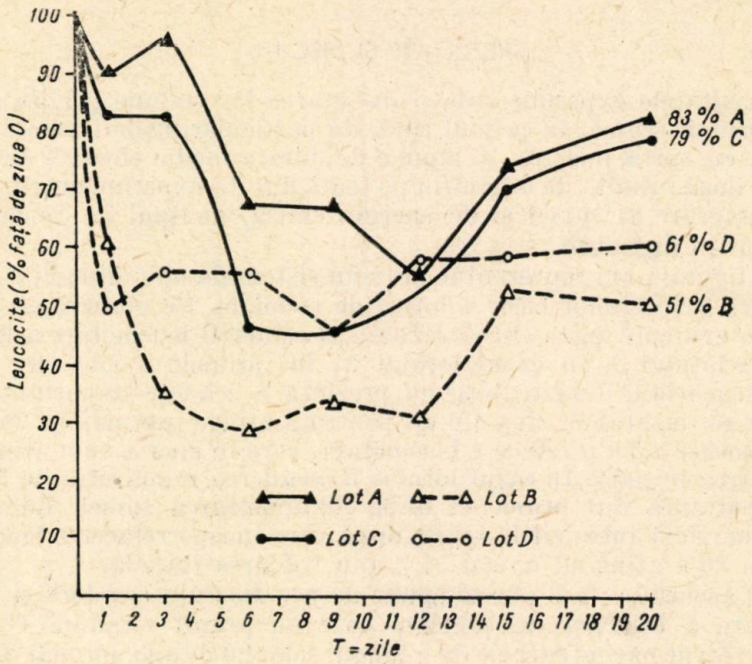


Fig. 1. — Variația leucocitelor în decursul iradierii interne cu ^{32}P.

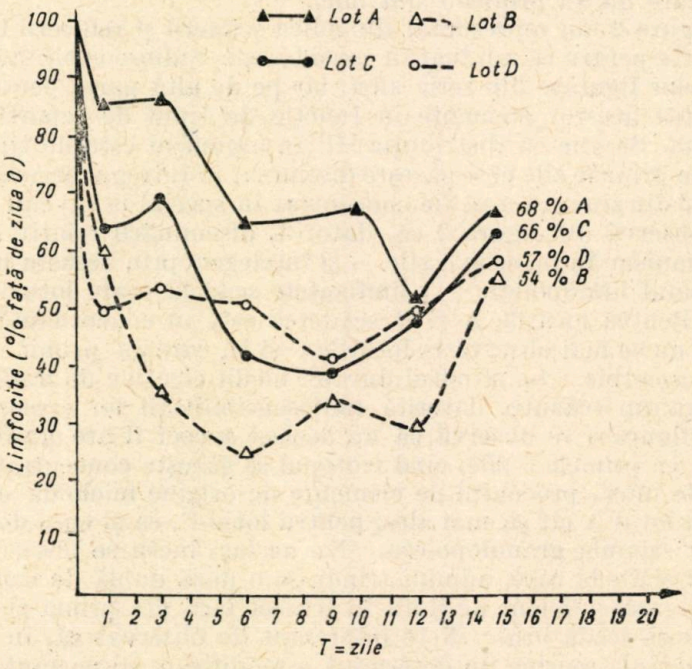


Fig. 2. — Variația limfocitelor în decursul iradierii interne cu ^{32}P.

neutrofilelor modificarea este evidentă atît pentru primele 3 zile în cazul loturilor A și C (120 și 173%), cît și pentru perioada ultimă în cazul loturilor B și D (51% refacere la lotul B, față de 76% refacere la lotul D).

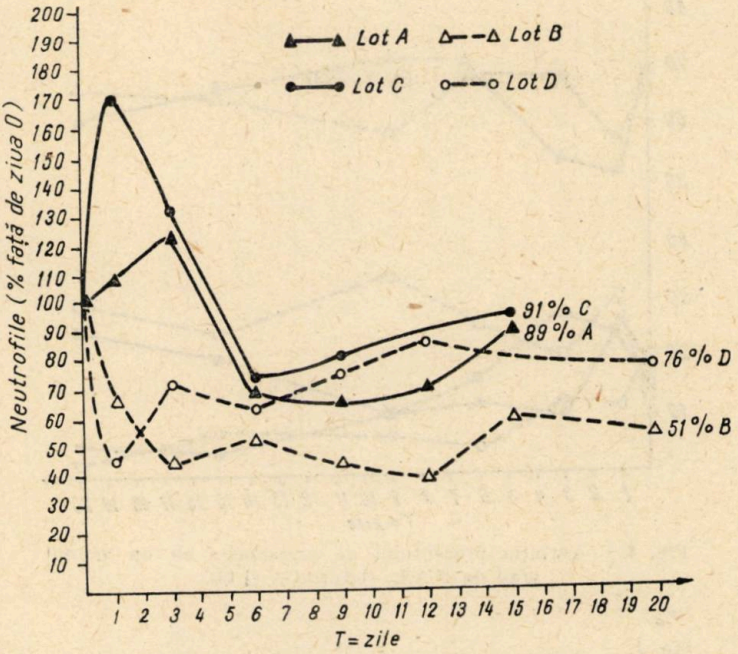


Fig. 3. — Variația neutrofilelor în decursul iradierii interne cu ^{32}P.

În figurile 4 și 5 am reprezentat variația fosfatazei alcaline granulocitare în decursul iradierii, pusă în evidență prin metoda citochimică. În figura 4 prezentăm situația fosfatazei pentru loturile A și B. Se constată că în decursul iradierii crește procentul granulocitelor cu un grad mărit de fosfatază alcalină (gradul II). Creșterea este mai importantă la lotul B decît la lotul A. Aceeași situație, însă într-o măsură mult mai accentuată, se observă și la loturile C și D, care au primit în dietă acid ascorbic. Din grafice reiese că în circulație apar în special granulocite, care au o activitate fosfatazică crescută, ca și cum acest nivel crescut al activității fosfatazice ar conferi granulocitelor o oarecare rezistență. În ceea ce privește acidul ascorbic, acesta pare să favorizeze supraviețuirea granulocitelor cu un grad crescut de fosfataze alcaline.

În figurile următoare am înfățișat modificările citospectrofotometrice ale nucleului limfocitar. În figura 6 este redată curba citospectrofotometrică tipică a limfocitului normal (cu maxime și minime de absorbție 460, 530, 575 mμ), iar în figura 7 curba citospectrofotometrică tipică a limfocitelor care apar în circulație în timpul iradierii. În figura 8 am reprezentat abaterile citospectrofotometrice la 575 mμ pentru limfocitele provenite

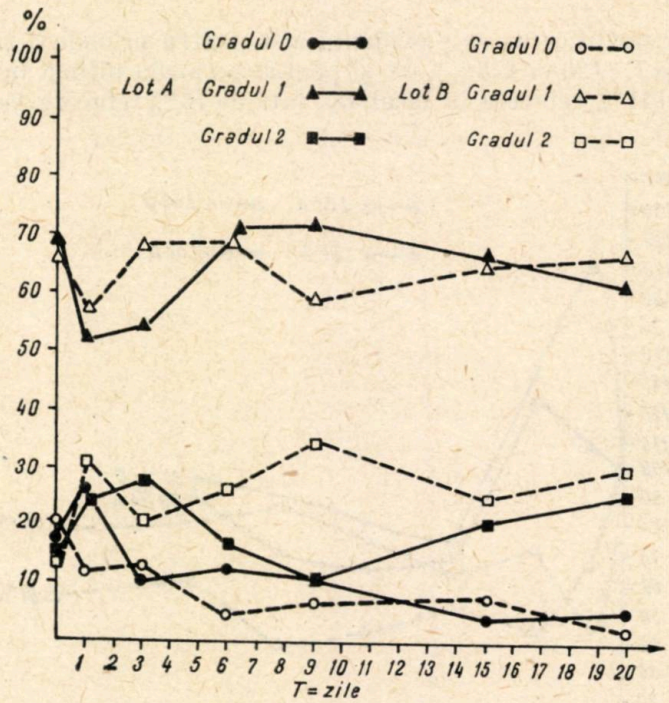


Fig. 4. — Variația procentului de granulocite cu un anumit grad de F.A.L. (loturile A și B).

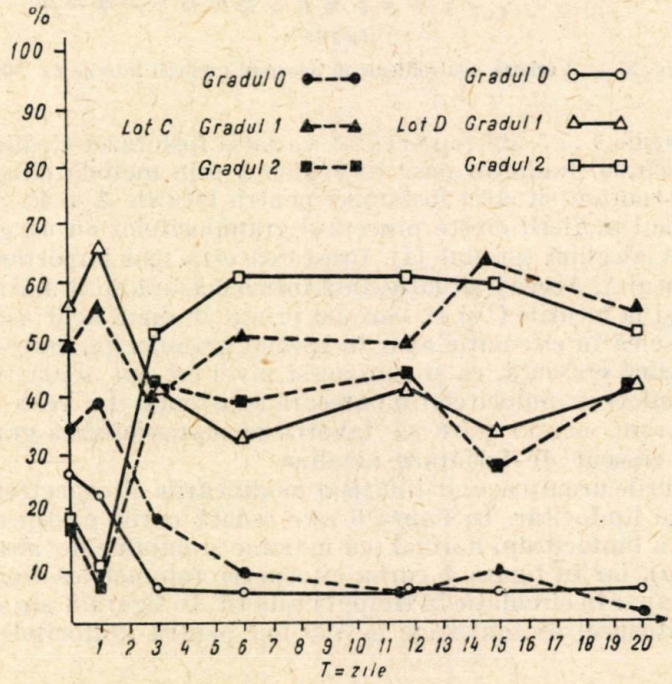


Fig. 5. — Variația procentului de granulocite cu un anumit grad de F.A.L. (loturile C și D).

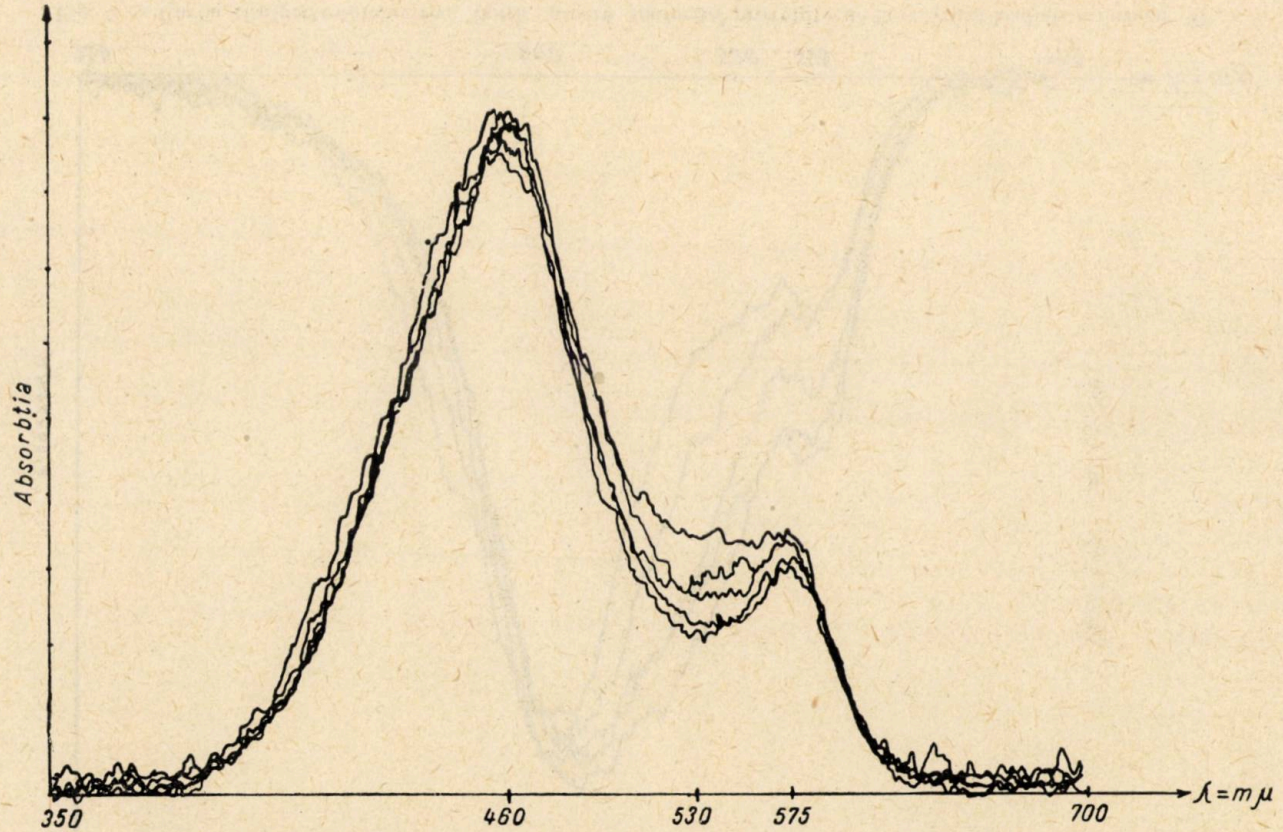


Fig. 6. — Curba citospectrofotometrică tipică pentru limfocite provenite de la șobolani martori (înainte de iradiere).

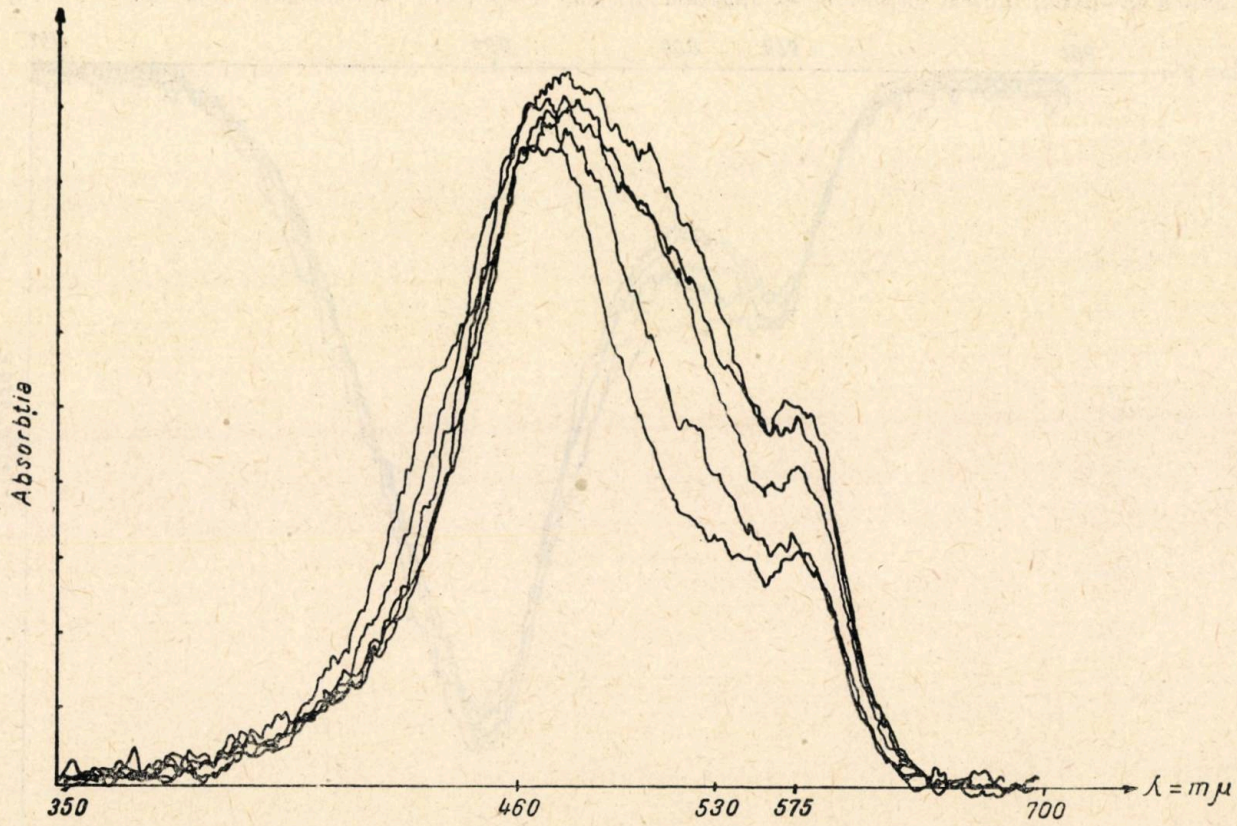


Fig. 7. — Curba citospectrofotometrică tipică pentru limfocitele provenite de la șobolani iradiați intern cu ^{32}P.

de la loturile A şi B în decursul iradierii. Am luat această lungime de undă, deoarece către lungimile de undă mai mari abaterile sînt maxime. În figura 9 am prezentat aceeaşi situaţie pentru loturile C şi D. În ambele

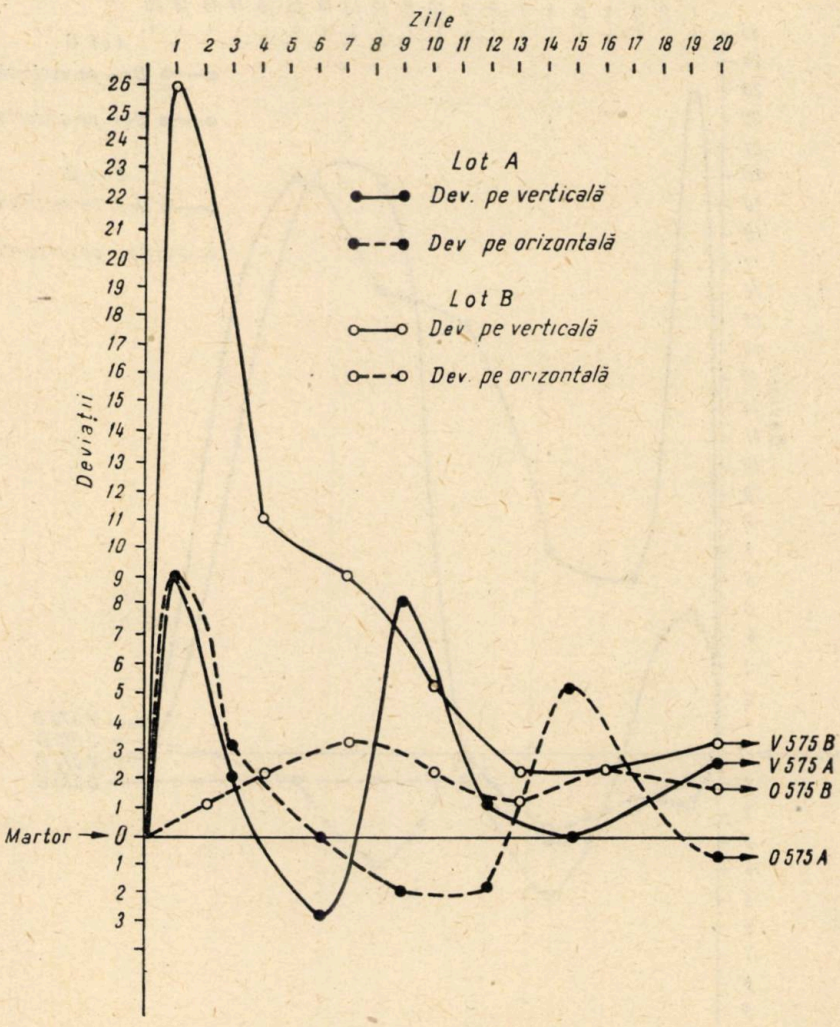


Fig. 8. — Curbe citospectrofotometrice ($\lambda = 575$ mμ) obţinute pe limfocitele loturilor A şi B.

reprezentări, linia orizontală (martor — 0) reprezintă situaţia limfocitului martor. Liniile pline ne dau abaterile pe verticală, iar liniile punctate reprezintă abaterile pe orizontală. Abaterile pe verticală trădează schimbări de ordin cantitativ la nivelul materialului nuclear, în timp ce abaterile pe orizontală reprezintă modificări de ordin calitativ. Se constată că atît

în cazul loturilor A şi B, care n-au primit acid ascorbic, cît şi în cazul loturilor C şi D, care au primit, materialul nuclear limfocitar diferă de cel

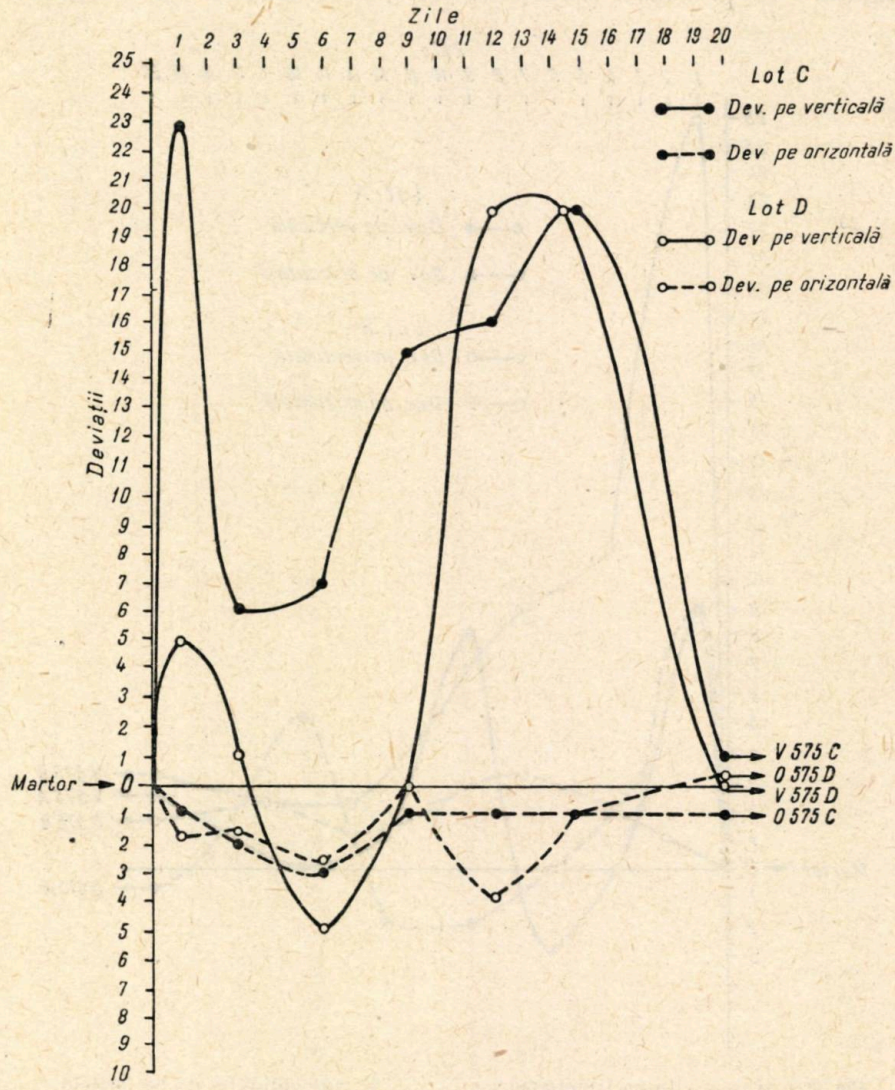


Fig. 9. — Curbele citospectrofotometrice ($\lambda = 575$ mμ) obţinute pe limfocitele loturilor C şi D.

normal, iar această diferenţiere este reflectată în capacitatea de fixare a colorantului de către nucleu.

Datele prezentate în lucrarea de faţă se înscriu pe linia aprofundării mecanismelor moleculare ale iradierii şi protecţiei organismului viu. Pînă

de curînd, acțiunea radiațiilor și a radioprotectorilor nu era apreciată decît după letalitatea animalelor de experiență sau după o serie de modificări morfologice care apăreau la nivelul organelor radiorezistente sau radiosensibile ale acestor animale. În ultimul timp, tot mai insistent se încearcă determinarea modificărilor fizico-chimice primare, precum și a modificărilor biochimice, biofizice, enzimatice. Un loc central în clarificarea mecanismelor moleculare ale bolii de iradiere îl ocupă transformările pe care le suferă acizii nucleici, și în special acidul dezoxiribonucleic din nucleul celular. Tocmai din acest motiv, în lucrarea de față am folosit drept radioprotector acidul ascorbic, care favorizează atît *in vitro* cît și *in vivo* sinteza acizilor nucleici (26). Stimularea sintezei acizilor nucleici nu este însă suficientă pentru a preveni apariția și instalarea bolii de iradiere. Acest lucru ne este dovedit de faptul că de multe ori, chiar dacă înainte sau imediat după iradiere, se administrează acid ascorbic, nu se observă nici un efect radioprotector. O serie de autori [35] au obținut chiar rezultate nefavorabile după administrarea acidului ascorbic. Ei explică acest fapt prin creșterea în organismul iradiat a concentrației produsului rezultat prin iradierea vitaminei C: acidul dehidroascorbic. Acest acid ar deprima procesele energetice și oxidative din celulele organismului. Din acest motiv ei asociază radiosensibilitatea mare a unor organe, ca măduva hematopoietică, țesutul limfatic, hipofiza, suprarenalele, gonadele, cu nivelul crescut al concentrației vitaminei C din organele respective (de 10—100 de ori mai mare decît în plasmă). Faptul că în literatură există date care înregistrează la nivelul organismului rezultate atît favorabile cît și nefavorabile după administrare de vitamină C se datorește, după părerea noastră, nu numai condițiilor experimentale care diferă de la autor la autor, ci și faptului că acidul ascorbic asigură o radioprotecție diferențiată după tipul celular. Acest lucru reiese clar din lucrarea noastră, în care se observă că, în timp ce neutrofilele sînt radioprotejate, limfocitele nu sînt influențate de prezența radioprotectorului în organism.

CONCLUZII

Administrarea de ^{32}P la șobolani martori determină scăderea și refacerea leucocitelor proporțional cu cantitatea de izotopi injectată. Acest fapt nu se observă în cazul loturilor radioprotejate cu acid ascorbic.

Radioprotecția relativă pe care o dă vitamina C se manifestă diferențiat, în funcție de tipul celular.

Acidul ascorbic favorizează supraviețuirea granulocitelor cu activitate fosfatazică maximă.

Modificările din materialul nuclear limfocitar nu pot fi diferențiate între loturile martore și cele care au primit acid ascorbic. Acest fapt îl atribuim, pe de o parte, radiosensibilității limfocitare crescute, iar pe de altă parte incapacității acidului ascorbic de a influența desfășurarea procesului lezional la nivelul nucleului limfocitar.

Prezentată la redacție
la 18 aprilie 1964

Catedra de biofizică a Institutului de medicină și farmacie, București

BIBLIOGRAFIE

1. J. PANY, Wien. Med. Wschr., **112**, 795 (1961).
2. F. I. RACINSKI, A. S. MOZJUHIN, N. M. SLAVACEVSKAIA, L. I. TANK, Uspehi himii *12* (1959).
3. M. FURNICĂ, G. FURNICĂ, St. cerc. Biochim., *2*, 251 (1962).
4. G. DUMITRESCU, Gh. FURNICĂ, Anal. rom. sov., seria chimie, *3*, 123 (1959).
5. R. I. WANG, Acta radiol. (Stockholm), **58**, 99 (1962).
6. W. BRICHZY, H. GRAEBNER, G. BARTH, Strahlentherapie, **117**, 265 (1962).
7. R. HUBER, W. BRUCHER, E. SCHROEDER, Acta Biol. Med. Germ., *4*, 529 (1960).
8. J. M. JONES, Nature, **185**, 96 (1960).
9. R. H. RIXON, J. F. WHITFIELD, Nature, **199**, 821 (1963).
10. S. P. YARMONENKO, Med. radiol., *8*, 32 (1963).
11. E. E. GANASSI, L. K. EIDUS, R. A. ARIFULINA, Radiobiologiya, *3*, 440 (1963).
12. A. CATCH, Nature, **191**, 715 (1961).
13. D. SEMENOV, I. TREGUBENKO, Nature, **193**, 391 (1962).
14. A. A. GORODETKI, *Vovedenie iz organizma nekotorih radioaktivnih veşcestv*, Medghiz, Kiev, 1959.
15. D. I. ZAKUTINSKI, D. I. PARFENOV, I. N. SELIVANOV, *Spravocinik po toksikologhii radioaktivnih izotopov*, Medghiz, Moscova, 1962.
16. R. JONARD, C. R. Acad. Sci., **250**, 185 (1960).
17. A. CHEVALLIER, S. MANUEL, C. R. Soc. Biol., **153**, 1 249 (1959).
18. Z. YA DOLGOVA, Med. Radiol., *1*, 67 (1962).
19. Z. YA DOLGOVA, Fed. Proceed. **21** (1962).
20. V. S. IUSUPOV, Med. Radiol., *4*, 79 (1959).
21. V. S. IUSUPOV, Biofizika, *5*, 638 (1960).
22. I. A. SEREBRENIKOVA, Biochimiia, **15**, 204 (1950).
23. Z. M. BACQ, P. FISCHER, Rad. Res. *7*, 365 (1957).
24. S. T. RISKULOVA, Radiobiologhiia, *3*, 24 (1963).
25. M. F. NESTERIN, Med. Radiol., *7*, 83 (1961).
26. B. I. GOLDSTEIN, V. V. GHERASIMOVA, L. G. KONDRATIEVA, Biohimiia, **19**, 531 (1954).
27. U. M. BACQ, P. ALEXANDER, *Principes de radiobiologie*, Masson, Paris, 1955.
28. C. T. NICOLAU, S. NICOARĂ, Med. int. *10*, 1173 (1962).
29. A. CIURES, V. VASILESCU, M. CONSTANTINOV, Fiziologia, *6*, 543 (1962).
30. GR. TURCU, C. DIMOFTACHE, P. WEXLER, V. VASILESCU, St. cerc. Biochim. *1*, 109 (1964).
31. M. ONCESCU, *Detectarea şi măsurarea radiaţiilor nucleare. Note de curs*, Bucureşti, 1960.
32. H. SCHWIEGH, F. TURBA, *Künstliche radioaktive Isotope in Physiologie. Diagnostik und Therapie*, **II**, Springer Verlag, 1961, 838.
33. J. VENNART, M. MINSKI, Brit. J. Radiol., **35**, 414 (1962).
34. A. A. GORODETKI, B. R. KIRICINSKI, N. F. LIPCAN, *Probleme de radiobiologie*, trad. C.D.M., 1961.
35. M. PATT, D. SMITH, E. TYREE, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **73**, 198 (1950).

PRIMA ÎNTRUNIRE A FEDERAȚIEI SOCIETĂȚILOR EUROPENE DE BIOCHIMIE

În numărul din 16 mai 1964 al revistei *Nature* (**202**/*4933*, 653—654, 1964) a fost relatată pe scurt prima întrunire a Societăților europene de biochimie, care a avut loc între 23 și 25 martie 1964 la Londra.

Federația societăților europene de biochimie și-a început activitatea de la 1 ianuarie 1964, în urma deciziei luate la Oxford, la 18 iulie 1963. La prima adunare a acestei noi asociații internaționale au luat parte peste 1 000 de biochimiști, reprezentînd cele 19 țări europene care s-au afiliat, și anume : Anglia, Austria, Belgia, Bulgaria, Cehoslovacia, Elveția, Finlanda, Franța, R.D.G., R.F.G., Italia, Norvegia, Olanda, Polonia, Portugalia, Spania, Suedia și Ungaria. De asemenea, au mai fost prezenți biochimiști sosiți individual din S.U.A. și U.R.S.S.

Un fapt regretabil — menționat de revistă — a fost acela că membrii delegației R.D.G., deși țară afiliată noii asociații, nu au putut fi prezenți la ședință deoarece nu li s-a acordat viza de intrare în Anglia.

Prima zi a fost consacrată unui simpozion pregătit de dr. F. Sanger (Cambridge), cu tema „Structura și activitatea enzimelor".

Următoarea zi a fost consacrată studiului activității biologice la nivel molecular, expunîndu-se date asupra unor proteine mai mult studiate din acest punct de vedere în ultimii ani, ale căror structuri primare sînt astăzi cunoscute, și anume ribonucleaza, chimotripsina și hemoglobina. Astfel, secvența aminoacizilor din ribonuclează este cunoscută de cîțiva ani, cea a hemoglobinei a fost recent elucidată, iar secvența completă, primară a chimotripsinei a fost prezentată pentru prima oară la această întrunire de dr. B. S. Hartley (Cambridge) și de dr. B. Keil (Praga). Deși aceste cercetări, în care se includ și lucrările similare efectuate cu tripsină, sînt de o importanță fundamentală, totuși astăzi se continuă cercetările pentru lămurirea naturii și relațiilor spațiale ale resturilor de aminoacizi din centrul activ al multor proteine. Au fost expuse astfel lucrări efectuate pentru precizarea centrului activ al ribonucleazei, al unor esteraze, al carbonic-anhidrazei și al chimotripsinei.

O lucrare mult apreciată a fost și aceea prezentată de dr. M. F. Perutz (Cambridge), care a discutat schimbările în subunitățile din lanțul β al hemoglobinei ce au loc în cursul oxigenării. Problema disociației hemoglobinei a fost reluată de mai mulți vorbitori și se pare că majoritatea proceselor implicate pot fi explicate, dacă se consideră că hemoglobina se găsește într-un echilibru între molecula tetramerului și subunitățile sale α și β, care sînt simetrice.

De asemenea au mai fost pregătite două colocvii în două probleme diferite, unul intitulat „Devierile congenitale ale metabolismelor", prezentat de prof. C.E. Dent, şi al doilea cu titlul „Biochimia cloroplastelor". pregătit de dr. I. Fewden (Londra).

În cursul lucrărilor s-a mai prezentat şi o privire de ansamblu făcută de prof. E. Lederer (Paris), cu titlul „Originea şi rolul funcţional al unor grupări metilice din catenele laterale ale acizilor graşi, sterolilor din plante şi chinonelor".

În afară de lucrările citate, au mai fost prezentate încă 139 de scurte comunicări, din diverse domenii ale biochimiei.

S-a preconizat ca astfel de adunări să aibă loc anual şi s-a stabilit ca, în cursul anului 1965, Austria să găzduiască întrunirea următoare.

SESIUNEA ŞTIINŢIFICĂ REPUBLICANĂ DE CHIMIE

La Iaşi, în perioada 28—31 mai a.c., a avut loc Sesiunea ştiinţifică republicană de chimie, organizată de Academia R.P.R. în colaborare cu Ministerul Învăţământului, Ministerul Industriei Petrolului şi Chimiei, Ministerul Industriei Uşoare, Ministerul Industriei Alimentare, Ministerul Metalurgiei, Ministerul Sănătăţii şi Prevederilor Sociale şi Consiliul Superior al Agriculturii.

Secţia de biochimie pură şi aplicată a ţinut opt şedinţe, prezidate succesiv de acad. prof. E. Macovschi, prof. dr. S. Oeriu, prof. dr. M. Ionescu, prof. dr. L. M. Buruiană, conf. F. Hodoşan, prof. dr. I. Manta, prof. dr. D. Moţoc şi prof. dr. G. Ghimicescu, la care s-au prezentat următoarele comunicări, din diferite domenii ale biochimiei :

I. PROBLEME GENERALE. METODE DE CERCETARE

Metoda despicării pentru cercetările biochimice comparative la plante, de E. Macovschi şi L. Botoşăneanu.

Electroforeza preparativă în gel de agaroză, de D. Moţet şi V. Gheţie.

Folosirea metodei dilatometrice la aprecierea grăsimilor, de B. Freier.

Studiul vinurilor de Cotnari din recoltele 1953—1962, de Gh. Ghimicescu, C. Ghimicescu, V. Cotea, E. Dumbravă şi M. Dallas.

Studiul etilismului din Moldova în perioada 1962—1961 sub aspect chimico-judiciar, de Gh. Ghimicescu, M. Cotrău, C. Ghimicescu şi S. Freund.

Distribuţia geochimică a Mn, Zn, Cu, Co şi Mo în unele cernoziomuri şi soluri brune de pădure din R.P.R., de V. Ababi, D. Afusoaie şi D. Dumitrescu.

Distribuţia geochimică a microelementelor (Mn, Zn, Cu, Co, Mo) în unele cernoziomuri din Dobrogea de sud, de V. Ababi şi M. Dumitrescu.

Contribuţii la cercetarea mobilităţii manganului activ din unele soluri forestiere, de V. Manu, L. Oprei şi I. Ochiu.

II. BIOCHIMIA PROTIDELOR

Contribuţii la studiul tripsinorezistenţei proteinelor globulare denaturate prin căldură, de M. Kerekes.

Polarografia proteinelor cerebrale acvosolubile în filogenie, de M. Şerban.

III. BIOCHIMIA LIPIDELOR

Cercetări în domeniul combinațiilor de incluziune. V. Combinații de incluziune în soluție între acizii biliari și acizii grași, de E. Angelescu și G. Nicolau.

IV. ENZIME

Cumularea de grupări —S—S—, factor esențial de tulburare a activității enzimatice și a echilibrului biochimic și biologic și rolul substanțelor cu grupări —SH asupra acestui dezechilibru, de S. Oeriu.

Studii de cinetică enzimatică. I. Variația energiei de activare cu concentrația în cazul unor enzime homotrope homoionice, de L. M. Buruiană și El. Hadarag.

Unele particularități ale sistemului enzimatic ceruloplasmină-p-fenilendiamină, de Cl. Nicolau, E. Thomas, O. Hörer și E. Stroescu.

Studii de cinetică enzimatică. II. Variația energiei de activare cu concentrația substratului în cazul unor enzime homotrope heteroionice, de L. M. Buruiană și El. Hadarag.

Enzime pectolitice din Aspergillus niger. *II. Purificarea și separarea diferitelor poligalacturonaze*, de S. Vasu.

Contribuții la studiul transmițătorilor de H. Problema cuprului în lanțul reacțiilor de oxidoreducere, de. M. Sibi și A. Busuioc.

V. HORMONI

Noi căi sintetice în domeniul hormonilor steroizi, de F. Hodoșan, I. Jude, A. Balogh, N. Șerban și A. Pop.

Cercetări experimentale asupra mecanismului de acțiune al unor antitiroidiene biologice, de Tr. C. Lazăr, V. Gorun și R. Cătană.

VI. BIOCHIMIA MICROBILOR. ANTIBIOTICE. IMUNOCHIMIE

Cuplarea clorurii de 1-dimetilamino-naftalin-5-sulfonil cu proteinele serice și purificarea conjugatelor obținute, de H.D. Schell și V. Gheție.

Dinamica potențialului de oxidoreducere în fermentația alcoolică, de D. Moțoc și N. Pană.

Acțiunea unor antibiotice asupra drojdiilor, de D. Moțoc și C. Dumitriu.

Acțiunea stimulatoare a unor preparate enzimatice din mucegaiuri asupra fermentațiilor, de D. Moțoc și S. Brad.

VII. BIOCHIMIE VEGETALĂ

Frînarea proceselor de lignificare a țesuturilor vegetale cu ajutorul antioxidanților, de M. Grigoraș, N. Simionescu și Cr. Simionescu.

Asupra procesului de lignificare în tumori vegetale, de A. Cernătescu-Asandei și Cr. Simionescu.

Considerații asupra interacțiunii dintre plante și unele protide introduse în ele, de E. Macovschi, A. Mihăescu și S. Ceaușescu.

Teoria adsorptivă a translocării substanțelor în plante, de E. Macovschi, V. Frunzeti și S. Rădulescu.

*Acțiunea paration*ului *asupra fosforului total, substanțelor reducătoare și consumului de oxigen din semințele, frunzele și rădăcinile sfeclei de zahăr*, de A. Ștefan.

Cercetarea prin cromatografie în faza gazoasă a uleiului de lavandă produs în R.P.R., de C. Ilie și Gl. Bălănescu.

Caracterul chimic ereditar al formelor biologice agricole și variabilitatea lui. Cazul speciei Zea mays, de M. Ionescu și S. Ionuț-Caragiani.

Modificarea producției și calității recoltelor de porumb prin hibridare, de M. Ionescu, T. Crăciun și A. Ciofu.

Conținutul în elemente fertilizante al unor reziduuri din industria textilă și comportarea lor ca îngrășăminte, de I. Popescu.

VIII. BIOCHIMIA ANIMALĂ

Rolul fosfagenului în excitabilitate și efort muscular, de E. Macovschi și C. Iordache.

Activitatea inhibitoare a p[bis(2-hidroxietil)-amino]-stilbenului asupra ascitei de tip Ehrlich, de M. Petrovanu, A. Popa și Fl. Moțoc.

Asupra unor factori de control ai metabolismului celular în unele cazuri patologice, de I. Manta.

Asupra unor factori mitocondriali de control ai oxidoreducerilor din țesutul cerebral în ateromatoza experimentală, de I. Manta, D. Bedeleanu, L. Mureșan, V. Gorun și O. Bîrzu.

Competiția substraturilor din ciclul acizilor tricarboxilici ca factor de control al oxidațiilor biologice, de I. Manta, O. Bîrzu, V. Botez, R. Cătană și I. Bodea.

Importanța cercetărilor biochimice pentru sporirea producției animale, de L. M. Buruiană.

Modificările unor proprietăți fizico-chimice ale macromoleculelor biologice sub acțiunea radiațiilor ionizante, de Gh. Furnică, C. Teodorescu și M. Radu.

Compușii adenozinfosforici (ATP, ADP, AMP) din mușchi în timpul excitației electrice cu și fără efort, de N. Moldoveanu.

Relația între conținutul în lipide peroxide și activitatea catalazică a diferitelor țesuturi, de M. Furnică.

Acțiunea endoxanului asupra conținutului în lipide al unor tumori experimentale, de C. Dinescu și P. Tăutu.

IX. BIOCHIMIA MEDICALĂ

Derivați ai acidului NN-di-(2-cloretil)-aminofosforic. O nouă subclasă de derivați ai acidului NN-di-(2-cloretil)-aminofosforic cu activitate anticanceroasă potențială, de V. Niculescu, P. Șerbescu, R. Antonescu și Gh. Ciuștea.

Derivați de sulfoniluree destinați să intercepteze fenomenele de glicoliză în procesul canceros, de V. Niculescu, Th. Gostea, R. Antonescu și M. Marșeu.

Noi derivați ai acidului p-di-(2-cloretil)-aminobenzoic, de M. Marșeu și Gh. Ciuștea.

Derivați sulfamidici de azotiperită, de V. Niculescu, Th. Gostea, R. Antonescu și M. Marșeu.

Leziuni biochimice de tip „lipsa de substrat" în hepatologie, de I. Szantai, T. Holan și M. Fărcășanu.

X. BIOCHIMIA NUTRIȚIEI

Contribuții la analiza antioxidanților din grăsimi alimentare și determinarea acidului nordihidroguaiaretic, de V. Galea și C. Costache.

XI. FARMACOLOGIE. TOXICOLOGIE

Cercetări toxicologice asupra potențialului cancerian al paradimetilaminoazobenzen, de V. Galea, N. Preda, M. Arieșan, G. Lupuțiu și Gh. Simu.

Asupra distrugerii substanțelor organice în vederea determinării metalelor toxice din alimente și conserve, de L. Caton, I. Herineanu, I. Axente și C. Tarabas.

Săruri cuaternare de amoniu derivate de la 2-amino-și 2,7-diaminofluoren, de F. Dobrescu, D. Kohn, A. Martin, M. Zalmann și N. Frăsinel.

SESIUNE DE REFERATE

În ziua de 4 iulie 1964 a avut loc, la Institutul de biochimie al Academiei R.P.R., sesiunea științifică internă de referate, închinată celei de-a XX-a aniversări a eliberării patriei noastre. Lucrările acestei sesiuni au avut ca temă „Cercetări în domeniul acizilor nucleici din plante și microorganisme".

Ședința a fost deschisă de acad. E. Macovschi, care a arătat importanța și măreția succeselor realizate sub înțeleapta îndrumare a Partidului Muncitoresc Romîn în toate domeniile de activitate, în decursul celor 20 de ani care au trecut de la istorica zi de 23 August 1944. A subliniat de asemenea consecințele pe care le-a avut acest eveniment pentru dezvoltarea științei noastre în general și a biochimiei în special.

Au fost apoi prezentate următoarele referate:

1. L. Botoșăneanu, *Metode de dozare ale acizilor nucleici în material biologic.*
2. S. Mihăescu, *Acidul ribonucleic și ribonucleaza în sucuri și extracte vegetale.*
3. V. Frunzeti, *Probleme de translocare a diferitelor substanțe și acizilor nucleici în plante.*
4. V. Alexandrescu, *Cercetarea acizilor nucleici din plante cu ajutorul izotopilor radioactivi.*
5. S. Vasu, *Rolul acizilor nucleici în transformarea microorganismelor.*

În cuvîntul de închidere, acad. E. Macovschi a scos în evidență importanța acestei sesiuni interne pentru institut, deoarece a prilejuit trecerea în revistă a celor mai importante metode de cercetare și a celor mai noi realizări pe plan mondial în domeniul acizilor nucleici, contribuind astfel la o mai bună informare a cercetătorilor care lucrează la problema „biochimia hibridării la plante", problemă ce face parte din planul tematic de cercetare al institutului.

SIMPOZIONUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE MOLECULARĂ

În zilele de 2 și 3 iulie 1964 a avut loc în București, la Centrul de documentare medicală al M.S.P.S., Simpozionul de biologie și patologie moleculară. Această manifestare științifică, prima de acest fel din țara noastră, a fost organizată — în cinstea celei de-a XX-a aniversări a eliberării patriei noastre — de către Centrul de cercetări și Centrul de hematologie al Ministerului Sănătății și Prevederilor Sociale, în colaborare cu Institutul de inframicrobiologie al Academiei R. P. Romîne.

În rapoartele prezentate a fost conturată orientarea modernă a cercetării biologice fundamentale, aceea de a pătrunde cu analiza proceselor fiziologice şi patologice ale materiei vii cît mai departe pe scara dimensiunilor accesibile. Raportul susţinut de conf. Cl. Nicolau (Centrul de cercetări al M.S.P.S.), intitulat *Probleme de biologie moleculară în cercetarea de radiobiologie*, s-a centrat pe problema deosebit de actuală a modificărilor produse la nivel molecular în materia vie de către energia radiantă şi pe metodele moderne utilizate în analiza acestora. După discutarea structurii şi a cineticii de formare a radicalilor liberi în urma iradierii materialului biologic, s-a analizat rolul unor elemente de tranziţie (Cu, Fe) în radiorezistenţa acizilor nucleici şi în diferite funcţii ale acestora şi s-au trecut în revistă rezultatele obţinute cu privire la formarea complecşilor cu transfer de sarcină *in vivo*, şi la funcţiile lor biologice eventuale. Raportul *Probleme de patologie moleculară în hematologie*, prezentat de dr. P. Teitel (Centrul de hematologie), după ce a subliniat importanţa deosebită a cercetărilor de biologie moleculară pentru elucidarea patogeniei unor boli de sînge, a prezentat sintetic datele faptice şi ipotezele noi privind hemoglobinozele şi eritroenzimopatiile. Au fost de asemenea trecute în revistă materialele experimentale care sprijină ipoteza unor alterări moleculare ale structurii acizilor nucleici din celulele sanguine malignizate, arătîndu-se perspectivele de lucru.

În prima zi a simpozionului au fost prezentate îndeosebi lucrări de biologie moleculară din domeniul radiobiologiei. *Studiul mecanismului şi cineticii activităţii oxidazice a ceruloplasminei*, de Cl. Nicolau, E. Thomas, O. Hörer, I. Pascaru şi Eugenia Stroescu (Centrul de cercetări al M.S.P.S.), a pus în evidenţă o relaţie de tip doză-efect între doza de iradiere administrată şi nivelul ceruloplasminei serice şi al cupremiei totale la şobolan. Ceruloplasmina a fost izolată şi purificată şi s-a studiat *in vitro* acţiunea ei enzimatică asupra oxidării *p*-fenilendiaminei; aceasta a fost apoi comparată cu oxidarea neenzimatică a *p*-fenilendiaminei, putîndu-se stabili, prin metoda spectroscopiei de rezonanţă electronică paramagnetică, că radicalii liberi ce iau naştere în aceste două tipuri de oxidare sînt diferiţi. Studiul spectrofotometric al cineticii unor intermediari formaţi în cursul reacţiei enzimatice a adus o serie de elemente noi şi originale, făcînd ca această lucrare să reprezinte, în ansamblul ei, o contribuţie românească valoroasă pentru enzimologie. Studiul *Influenţei radiaţiilor şi a sensibilizatorilor asupra transferului de electroni în sistemul hemoglobină-methemoglobină*, de R. Olinescu, E. Thomas, L. Costea şi conf. Cl. Nicolau (Centrul de cercetări al M.S.P.S.), a arătat rolul unor radiosensibilizatori şi al iradierii asupra raportului normal hemoglobină-methemoglobină, pus în evidenţă prin urmărirea consumului de oxigen al hematiilor de şobolan. Au fost de asemenea prezentate lucrări asupra influenţei radiaţiilor ionizante asupra structurii moleculare a acetilcolinei (Cl. Nicolau, V. Mureşan, A. Cristea), asupra clorpromazinei marcate cu ^{35}S (Şt. Grigorescu, C. Nedelcu, Cl. Nicolau) şi a strofantinei (V. Mureşan, V. Voicu, Al. Cristea), urmărindu-se corelaţia dintre modificările structurii moleculare a acestor agenţi farmacodinamici şi activitatea lor biologică. În cazul acetilcolinei, s-a confirmat ipoteza relaţiei dintre activitatea ei nicotinică şi funcţia carboxilică al cărei oxigen poate primi uşor un surplus de sarcină negativă, imprimîndu-i o activitate specifică crescută.

Prof. C. T. Nicolau, membru corespondent al Academiei R.P.R., P. Teitel, V. Bratu, Agripina Xenakis, I. Marcu şi C. Predescu au prezentat bazele moleculare ale methemoglobinemiilor congenitale şi experienţa Centrului de hematologie în studierea acestor afecţiuni. În cadrul comunicării *Factori fizico-chimici şi metabolici care influenţează reologia eritrocitelor* (P. Teitel şi C. T. Nicolau) a fost precizat domeniul de preocupări al hemoreologiei, iar pe baza datelor experimentale proprii a fost formulată o schemă patogenică a traducerii pe plan clinic a leziunilor moleculare ale eritrocitelor prin intermediul alterării reologiei lor.

Ziua a doua a lucrărilor simpozionului a fost consacrată unor cercetări asupra acizilor nucleici. Punerea la punct și utilizarea unei metode moderne, deosebit de sensibilă pentru punerea în evidență a unor cantități foarte reduse (10^{-12} g) de microelemente prin analiză spectrometrică gama după activare în flux de neutroni (Cl. Nicolau și S. Bergheanu, de la Centrul de cercetări), a arătat că, în urma iradierii acizilor nucleici, apar modificări semnificative ale conținutului lor în microelemente. Dată fiind importanța acestora în stabilizarea macromoleculelor de acizi nucleici, această lucrare aduce contribuții originale pe plan mondial și ridică probleme noi de radiobiologie, deschizînd, totodată, largi perspective de lucru.

Majoritatea lucrărilor comunicate în această ședință au fost efectuate la un nivel tehnic deosebit, în cadrul Institutului de inframicrobiologie al Academiei R.P.R. Au fost prezentate rezultatele unor cercetări comparative: asupra denaturării și renaturării unor acizi ribonucleici supuși acțiunii căldurii (R. Portocală, J. Samuel, L. Popa și Elena Prahoveanu); asupra fracționării pe coloana de schimbători de ioni a acidului ribonucleic extras din virusul gripal de tip A și a celui extras din membrana corioalantoidiană a oului infectat cu acest virus (R. Portocală, L. Popa, J. Samuel, A. Morfei, G. Diculescu și V. Lăcătuș). De asemenea, s-au prezentat lucrări cu caracter teoretic și tehnic asupra cromatografiei pe coloană a unor acizi nucleici cu ajutorul unei metode în flux continuu (R. Portocală, L. Popa, J. Samuel, A. Morfei și V. Lăcătuș) și asupra mecanismului de fracționare a acidului ribonucleic pe coloană de albumină metilată și DEAE-celuloză (L. Popa și R. Portocală). Pe lîngă datele noi pe care le-au adus, aceste cercetări au pus în evidență posibilitățile mari pe care cromatografia analitică pe schimbători de ioni le oferă pentru studiile comparative ale diferitelor tipuri de acizi nucleici.

Influența condițiilor diferite de conservare a acizilor nucleici extrași din țesuturi animale asupra coeficientului de extincție molară al fosforului a fost comunicată de un colectiv al Centrului de hematologie (C. T. Nicolau, I. Marcu, Agripina Xenakis, V. Bratu și P. Teitel). Z. Simon (Centrul de chimie fizică al Academiei R.P.R.) a prezentat un punct de vedere chimic asupra bazelor moleculare ale interacțiunilor specifice dintre ADN și histone, care prezintă un interes deosebit pentru înțelegerea mecanismului de represie a genelor operatoare.

În ansamblul lor, comunicările prezentate și discuțiile purtate pe marginea lor au arătat preocuparea de a aborda probleme actuale, deosebit de importante, de pe pozițiile moderne ale biologiei și patologiei moleculare. Utilizîndu-se o tehnicitate modernă, foarte înaltă, au fost aduse contribuții originale valoroase în acest domeniu, care subliniază faptul că cercetarea științifică din patria noastră este situată la nivel mondial și pune în lumină căile pentru dezvoltarea ei în continuare.

P. Teitel
(Centrul de hematologie)

ȘEDINȚELE SECȚIEI DE BIOCHIMIE MEDICALĂ A SOCIETĂȚII DE FIZIOLOGIE A UNIUNII SOCIETĂȚILOR DE ȘTIINȚE MEDICALE

În ziua de 28 octombrie 1963 a avut loc, la sediul U.S.S.M., ședința prezidată de acad. prof. Eugen Macovschi, cu urmatoarea ordine de zi:

1. Mihail Șerban și Dinu Tănăsescu (Institutul de biochimie), *Cercetarea comparativă a proteinelor sarcoplasmatice din musculatura striată și netedă.* Lucrarea s-a publicat în nr. 4 din 1963 al revistei „Studii și cercetări de biochimie".

2. H. D. Schell (Institutul de biochimie), *Interacţiunea unor săruri cuaternare de amoniu fluorescente cu proteinele musculare.* Lucrarea s-a publicat în nr. 4 din 1963 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

3. Alexandrina Popescu (Maternitatea Filantropia, Bucureşti), *Endosmoza iodului în colul uterin normal şi patologic.*

În ziua de 27 decembrie 1963 a avut loc, la sediul U.S.S.M., şedinţa prezidată de prof. Matiu Ionescu, cu următoarea ordine de zi:

1. S. Căpîlnă şi St. Tamajdan (Catedra de biochimie, Facultatea de farmacie, Bucureşti), *Aspecte patoenzimologice cu influenţe ereditare.*

În ziua de 20 martie 1964 a avut loc, la sediul U.S.S.M., şedinţa prezidată de conf. dr. Eugenia Soru, membru corespondent al Academiei R.P.R., cu următoarea ordine de zi:

1. I. Manta, D. Bedeleanu şi O. Bîrzu (Catedra de biochimie, I.M.F.—Cluj): *Biochimia ateromatozei. Nota VI. Asupra factorilor de limitare a glicolizei şi consumului de oxigen tisular în ateromatoza experimentală.* Lucrarea s-a publicat în nr. 1 din 1964 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

2. Gh. Furnică şi A. Dimitriu (Institutul de igiena şi protecţia muncii, Bucureşti), *Studiul acţiunii compuşilor radiomimetici (N-iperite) asupra macromoleculelor proteice.* Lucrarea s-a publicat în nr. 1 din 1964 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

3. Corneliu Medeşan (Institutul de biochimie), *Compararea unor metode de dozare a fosfocreatinei musculare în diferite condiţii experimentale.* Lucrarea s-a publicat în nr. 1 din 1964 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

În ziua de 12 iunie 1964 a avut loc la sediul U.S.S.M. şedinţa prezidată de acad. prof. Eugen Macovschi, cu următoarea ordine de zi:

1. Prof. M. Mezincescu (Institutul medico-farmaceutic, Bucureşti, Catedra de biochimie), *Controlul şi integrarea proceselor metabolice prin proteine allosterice.* Lucrarea s-a publicat în nr. 2 din 1964 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

2. A. Sporn şi I. Dinu (Institutul de igienă şi protecţia muncii), *Studii enzimatice în intoxicaţia experimentală cu arsen.* Lucrarea s-a publicat în nr. 2 din 1964 al revistei „Studii şi cercetări de biochimie".

În ziua de 4 iulie 1964 a avut loc, la sediul Institutului de biochimie, şedinţa prezidată de acad. prof. Eugen Macovschi, cu următoarea ordine de zi:

1. O. Costăchel, M. Furnică, El. Popa şi O. Popovici (Institutul de oncologie), *Influenţa ADN extras din ficatul şobolanilor normali şi iradiaţi asupra activităţii catalazei hepatice.*

2. R. Portocală şi L. Popa (Institutul de inframicrobiologie), *Tehnica de eluţie şi determinarea în flux continuu a ARN fracţionat pe coloana de DEAE-celuloză.*

Lucrarea se publică în acest număr al revistei.

3. Gh. Furnică (Institutul de igiena şi protecţia muncii), *Studiul procesului de schimb ionic la acizii nucleici şi proteine.*

4. N. Voiculeţ şi C. Vilău (Institutul de oncologie), *Efectul sarcolizinei asupra incorporării formiatului—C^{14} în fracţiunea proteică a acizilor nucleici din celulele ascitei Erlich.*

CORNEL BODEA, în colab. cu: VALER FĂRCĂŞAN, ELENA NICOARĂ, HORIA SLUŞANSCHI, *Tratat de biochimie vegetală. Partea I. Fitochimie*, Edit. Acad. R.P.R., Bucureşti, 1964.

În Editura Academiei R.P.R. a apărut cartea *Tratat de biochimie vegetală. Partea I. Fitochimie*, de Cornel Bodea, Valer Fărcăşan, Elena Nicoară, Horia Sluşanschi, care face parte din *Tratatul de biochimie vegetală* ce urmează să cuprindă două părţi: partea I, *Substanţele componente ale organismelor vegetale*, reprezentînd o biochimie statică (Fitochimie), şi partea a II-a, *Mecanismul chimic al biosintezei şi biodegradării substanţelor organice din plante*, reprezentînd o biochimie dinamică.

Problemele din partea I sînt tratate în trei volume, primele două fiind consacrate substanţelor organice întîlnite în regnul vegetal, iar volumul al treilea substanţelor minerale şi compoziţiei chimice a principalelor plante de cultură.

Tratatul se adresează în special cercetătorilor biochimişti, chimişti şi biologi din institutele de cercetare, precum şi unui cerc larg de specialişti care activează în producţie şi se interesează de nivelul actual al cunoştinţelor în acest domeniu.

Volumul I cuprinde 746 de pagini, în care în 5 capitole sînt descrişi componenţii organici plastici şi energetici (glucide, protide, lipide, acizi organici şi lignine) şi în 6 capitole ergonii (ureea şi derivaţii, acizi nucleici, porfirine, carotinoide, enzime, vitamine şi substanţe de creştere).

Capitolul 1 se ocupă de descrierea monoglucidelor, oligoglucidelor şi poliglucidelor. Sînt date configuraţia spaţială, izomeria α — β, proprietăţile fizice şi chimice, produşii de transformare ai ozelor (reducere şi oxidare, sub acţiunea alcaliilor şi acizilor). Sînt descrise ozele şi derivaţii întîlniţi în regnul vegetal, precum şi sinteza şi degradarea lor *in vitro*. Oligoglucidele sînt descrise pe grupe, sînt arătate răspîndirea lor în regnul vegetal, rolul fiziologic, principiile de izolare, identificare şi determinare, precum şi utilizările lor practice. În continuare sînt descrise proprietăţile fizice şi chimice, structura şi clasificarea poliglucidelor. Sînt date pe larg poliglucidele omogene, neomogene, precum şi principiile de izolare, identificare şi dozare a lor.

Capitolul al 2-lea — protide — cuprinde descrierea aminoacizilor, constituţia, proprietăţile, transformările biochimice şi sinteza lor şi a derivaţilor apropiaţi care se găsesc în plante. Oligopeptidele şi protidele sînt redate cu constituţia lor chimică, proprietăţile şi răspîndirea lor. Atît la aminoacizi, cît şi la protide se dau principiile de izolare, purificare şi dozare, rolul lor fiziologic şi utilizările practice.

Capitolul al 3-lea tratează despre lipidele simple (gliceride, steride şi steroli, fitosteride şi fitosteroli, ceruri vegetale, ceride, etolide) şi complexe (fosfatide, cerebrine şi cerebrozide, glicosul-

folipide), arătîndu-se constituţia chimică, rolul lor, răspîndirea, principiile de izolare şi determinare, precum şi utilizările practice. Se dă o tabelă a principalelor gliceride vegetale (circa 100), în care se dau constantele fizice, chimice şi conţinutul în acizi graşi.

Capitolul următor se ocupă de acizii organici care se găsesc în plante sub diferite forme, arătîndu-se — în afară de compoziţia lor chimică — şi proprietăţile, răspîndirea în plante, principiile de izolare, identificare, determinare, importanţa lor fiziologică şi practică.

În capitolul rezervat lignineloi, după prezentarea structurii, a proprietăţilor fizice şi chimice generale, sînt redate constituţia lignineloi native, răspîndirea şi rolul lor în regnul vegetal, precum şi importanţa practică.

Începînd cu capitolul al 6-lea se face descrierea ergonilor.

Ureea, tioureea, ureidele, pirimidinele, purinele şi pterinele formează un capitol separat, urmat de capitolul nucleozizilor, nucleotidelor, acizilor nucleici şi substanţelor înrudite — ambele capitole prezentînd cunoştinţele actuale în aceste domenii.

Capitolul al 8-lea — porfirine şi alţi pigmenţi pirolici — se ocupă cu descrierea metaloporfirinelor, porfirinelor vegetale şi a altor pigmenţi pirolici (prodigiozina, ficobiline).

Capitolul următor se ocupă de carotinoidele cu 40 de atomi de carbon şi cu mai puţin de 40 de atomi de carbon. În acest capitol se dă o tabelă cu 85 de carotinoide găsite în plantele superioare şi inferioare, în care sînt date structura lor chimică, proprietăţile fizice, plantele în care se găsesc şi autorii care le-au cercetat.

Penultimul capitol se ocupă de enzime şi vitamine. Sînt date proprietăţile speciale ale enzimelor, se fac consideraţii generale asupra structurii enzimelor, iar în continuare se dă structura enzimelor de origine vegetală cunoscute. Într-o tabelă sînt ilustrate principalele grupe de enzime vegetale, iar în continuare sînt date principiile de izolare, purificare, determinare, importanţa lor fiziologică şi utilizările practice.

Ultimul capitol tratează despre substanţe de creştere (fitohormoni şi auxine). Se prezintă principiile de extragere, identificare şi dozare, rolul lor fiziologic şi importanţa practică.

Volumul se încheie cu un index alfabetic de substanţe care uşurează consultarea tratatului.

Această carte prezintă un interes deosebit pentru specialişti, deoarece oglindeşte cunoştinţele actuale în acest domeniu şi leagă cunoştinţele teoretice de structură chimică, proprietăţi, rol fiziologic cu întrebuinţările practice în toate domeniile; ea redă cuceririle noi în biochimia plantelor şi caută să reliefeze înlănţuirea între fenomenele biochimice. Apariţia ei este de un real folos şi reprezintă un succes în acest domeniu.

Victoria Alexandrescu
Institutul de biochimie al
Academiei R.P.R., Bucureşti

„Studii şi cercetări de biochimie" publică articole originale, de nivel ştiinţific superior, din toate domeniile biochimiei. Sumarele revistei sînt completate cu alte rubrici, ca: *Viaţa ştiinţifică*, în care, prin scurte note, sînt aduse la cunoştinţă cititorilor unele manifestări ştiinţifice din domeniul biochimiei: congrese, simpozioane, consfătuiri, schimburi de experienţă între cercetătorii romîni şi cei străini etc. *Recenzii* — în care sînt prezentate cele mai recente lucrări de specialitate apărute în ţară şi peste hotare.

NOTĂ CĂTRE AUTORI

Autorii sînt rugaţi să înainteze articolele, notele şi recenziile dactilografiate la două rînduri. Tabelele vor fi dactilografiate pe pagini separate, iar diagramele vor fi executate în tuş, pe hîrtie de calc. Tabelele şi ilustraţiile vor fi numerotate cu cifre arabe. Figurile din planşe vor fi numerotate în continuarea celor din text. Se va evita repetarea aceloraşi date în text, tabele şi grafice. Explicaţia figurilor va fi dactilografiată pe pagină separată. Citarea bibliografiei în text se va face în ordinea numerelor. Numele autorilor va fi precedat de iniţiale. Titlurile revistelor citate în bibliografie vor fi prescurtate conform uzanţelor internaţionale.

Autorii au dreptul la un număr de 50 de extrase, gratuit.

Responsabilitatea asupra conţinutului articolelor revine în exclusivitate autorilor.

Corespondenţa privind manuscrisele, schimbul de publicaţii etc. se va trimite pe adresa Comitetului de redacţie: str. Popovici nr. 20, Bucureşti 2, Raionul 30 Decembrie.

LUCRĂRI APĂRUTE ÎN EDITURA ACADEMIEI R. P. R.

IONEL HAIDUC, **Introducere în chimia ciclurilor anorganice,** 339 p., 16 lei.

C. D. NENIȚESCU, I. P. CANTUNIARI și I. G. DINULESCU, **Nomenclatura chimiei organice,** 96 p., 3,65 lei.

ILIE VASILESCU, **Enzimele,** 429 p., 22,80 lei.

R. PORTOCALĂ și N. I. IONESCU, **Microscopia electronică în biologie și inframicrobiologie,** 180 p., 9,90 lei.

C. C. OPRESCU, **Infecția cu micobacterii,** 224 p. + 5 pl., 12,20 lei.

C. VELICAN, DOINA VELICAN și N. CARP, **Histochimia mucopolizaharidelor,** 284 p. +24 pl., 20 lei.

C. BODEA și colab., **Tratat de biochimie vegetală,** vol. I, 747 p. + 4 pl. + 2 pl. color, 41 lei.

TS. CERC. BIOCHIMIE, Tomul 7, Nr. 3, p. 313—462, BUCUREȘTI, OCTOMBRIE 1964

c. 3225 I. P. „Informația"

43816

Lei 12.—